

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Psoriaasiga seotud neuronaalsete valkude ekspressiooni uurimine

Bakalaureusetöö

12 EAP

Dmitri Šišmintsev

Juhendajad PhD Kristina Mäemets-Allas

MD, PhD Viljar Jaks

TARTU 2020

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Nahk	7
1.1.1. Naha histoloogiline ehitus	7
1.1.3. Naha regeneratsioon kahjustuse korral	10
1.2 Psoriaas	12
1.2.1. Psoriaatilise naha histopatoloogia	13
1.2.2. Nahatraumad psoriaasi kontekstis	15
1.2.3. Psoriaasi klassifikatsioon ja morfoloogia	17
1.2.4. Psoriaasi etioloogia hüpoteesid	19
1.2.5. Fibroblastide roll psoriaasis	26
2.EKSPERIMENTAALOSA	28
2.1. Töö eesmärgid	28
2.2. Materjalid ja meetodid	29
2.2.1. Nahalõikude allikas	29
2.2.2. Koelõikude lõikamine	29
2.2.3. Immuunofluorestsentsanalüüsil kasutatud antikehad	29
2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüs	31
2.2.5. Fluorestsentsmikroskoopia	32
2.3. Tulemused ja arutelu	33
2.3.1. CD271 kui panneuronaalne marker närvikiudude arhitektuurika võrdlemisel	33
2.3.2. Neuropeptiidide ja nende retseptorite ekspressiooni muutused nahas	37
2.3.3. Valitud markerite (Nnat, ACTA2, CD271) ekspressiooni võrdlus terve ja psoriaatilise naha epidermises, veresoontes ja dermise rakkudes	41
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY	48
KIRJANDUSE LOETELU	49

KASUTATUD LÜHENDID

ACTA2 – aktiin alfa 2 (ingl *actin alpha 2*)

ADAMTSL5 – ingl *A Disintegrin-like and Metalloprotease domain containing Thrombospondin Type 1 motif-like 5*

APC – antigeeni presenteerivad rakud (ingl *antigen-presenting cell*)

BDNF – tserebraalne neurotroofne faktor (ingl *Brain-derived neurotrophic factor*)

bFGF – peamine fibroblastide kasvufaktor (ingl *basic fibroblast growth factor*)

CALCR – kaltsitoniini retseptor (ingl *calcitonin receptor*)

CD – diferentseerumise klaster (ingl *cluster of differentiation*)

CGRP – kaltsitoniini geeni sugulaspeptiid (ingl *calcitonin gene-related peptide*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

ECM – ekstratsellulaarne maatriks (ingl *extracellular matrix*)

FB – fibroblast

GRP – gastriini vabastav peptiid (ingl *gastrin releasing protein*)

HAEC – inimese aordi endoteliaalsed rakud (ingl *human aortic endothelial cells*)

HIV – inimese immuunpuudulikkuse viirus (ingl *human immunodeficiency virus*)

HLA – inimese leukotsüütide antigeenid (ingl *human leukocyte antigens*)

HPV – inimese papillomavirus (ingl *human papillomavirus*)

IFA – immunofluorestsentsanalüüs (ingl *immunofluorescence assay*)

KSC – keratinotsüüdi tüvirakk (ingl *keratinocyte stemcell*)

mAb – monoklonaalne antikeha (ingl *monoclonal antibody*)

Mcp-1 – monotsüüdi kemoatraktiivne proteiin-1 (ingl *monocyte chemoattractant protein-1*)

NGF – neuraalne kasvufaktor (ingl *neural growth factor*)

NF-κB – aktiveeritud B rakkude tuuma faktor kappa-kerge-ahela-enhanser (ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK1R – neurokiniini 1 retseptor (ingl *neurokinin 1 receptor*)

Nnat – neuronatiin (ingl *neuronatin*)

NT-3 – neurotrofiin-3 (ingl *neurotrophin-3*)

NT-4 – neurotrofiin-4 (ingl *neurotrophin-4*)

pAb – polükloonaalne antikeha (ingl *polyclonal antibody*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl *phosphate buffered saline*)

PEDF – ingl *pigment epithelium-derived factor*

PGP9.5 – ingl *protein gene product 9.5*

PLA2G4D – fosfolipaas A2 grupp 4D (ingl *phospholipase A2 Group IVD*)

sAg – superantigeen (ingl *superantigen*)

SP – substants P (ingl *substance P*)

SCF – tüvirakkude faktor (ingl *stem cell factor*)

TGF- β – transformeeriv kasvufaktor beta (ingl *transforming growth factor beta*)

TNF- α – tuumor nekroosi faktor alfa ehk kaheksiin (ingl *tumor necrosis factor alfa ehk cachexin*)

TrkA – tropomüosiini retseptori kinaas A (ingl *tropomyosin receptor kinase A*)

TUBB3 – klass 3 tubuliin beta (ingl *tubulin beta class III*)

VEGF – vaskulaarse endoteeli kasvufaktor (ingl *vascular endothelial growth factor*)

VIP – vasoaktiivne instestinaalne peptiid (ingl *vasoactive intestinal peptide*)

VWF – von Willebrandi faktor (ingl *von Willebrand factor*)

Psoriaasiga seotud neuronaalsete valkude ekspressiooni uurimine

Psoriaas on levinud haigus, mille uurimise ajalugu on pikk, kuid alles praegu hakkab tekkima arusaam, missugused faktorid ja mil moel psoriaasi põhjustavad. Käesoleva töö eesmärk oli kirjeldada psoriaasiga seotud naha ehituslikke ja molekulaarseid muutusi ning tuvastada nendevahelisi seoseid fookusega närvikoel ja neuronaalsetel valkudel. Selleks uuriti IFA meetodiga tervetelt ja psoriaasi põdevatelt inimestelt saadud nahaproovidest neuropeptiidide, nende retseptoreid, neurotrofiinide retseptoreid ja neuronatiini lokalisatsiooni ja ekspressiooni. Nimetatud valkude ko-visualiseerimisel neuronite ja veresoonemarkeritega saadi tulemuseks Nnat ja PGP9.5 seni psoriaasiga assotsieeritamata dermaalse ekspressiooni muster, kirjeldati NGF-assotsieeritud sensoorset neuropaatiat psoriaatilises nahas ning samuti ebatüüpilist CALCR epidermaalse ekspressiooni mustrit.

Märksõnad: psoriaas, neurogeenne põletik, neuraalsed valgud.

CERCS kood: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

About psoriasis associated neuronal protein expression

Psoriasis is worldwide spread disease with long history of research, but recently the mechanism of psoriasis has become more understandable. The main goal of this work was to describe molecular alterations related to psoriasis associated skin architecture and identify the relationship between these alterations with focus on nervous tissue and neural proteins. Studies with skin biopsies of healthy and psoriatic skin have been performed, in which neuropeptides, their receptors, receptors of neurotrophins and nervous system development regulatory peptide localization and expression degree were estimated by IFA. Covisualization of mentioned proteins with other skin components, including neural and vascular markers, permitted to describe new Nnat and PGP9.5 dermal expression profile and NGF-associated sensory neuropathy in psoriatic skin, fixate rare CALCR epidermal expression profile.

Keywords: psoriasis, neurogenic inflammation, neural proteins.

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISSEJUHATUS

Nahk on mitmekomponentne pidevalt regenereeruv organ. Nahk on pidevas kontaktis ümbritseva keskkonnaga ning kaitseb organismi selle kahjulike mõjude eest. Seetõttu on erinevaid dermatoose, sealhulgas psoriaasi, mille kroonilise mõju tõttu on väga suure naha osa funktsioon vahepeal häiritud, juba pikalt ja aktiivselt uuritud. Kuna psoriaasiga on seotud mitmeid komplikatsioone ning mõned teised patoloogilised seisundid, kaasa arvatud depressioon, on paralleelselt teadmiste kogunemisega psoriaasi kohta tekkinud arusaam psoriaasist kui süsteemsest haigusest (Grozdev jt., 2014).

Psoriaasi eristatakse teistest haigustes alates 19. sajandist, kuid haiguse etioloogiast ja patogeneesist on selle keerukuse tõttu hakatud aru saada alles viimaste aastakümnete jooksul. Psoriaasi teemal on kirjutatud tuhandeid artikleid ja on välja töötud terve rida psoriaasivastaseid ravimeetodeid, kuid sellele vaatamata tuvastatakse peaaegu igal aastal ja pööratakse tähelepanu järjest uutele psoriaasi etiopatogeneesi aspektidele. Märkimisväärselt vähe on tähelepanu pööratud psoriaasi spontaanse remissiooni ja annullaarse psoriaasi mehhanismidele, mille detailine uuring võimaldaks läheneda probleemi lahendusele uuest vaatenurgast.

Kui varasemalt domineeris arusaam, et psoriaas on autoimmuunne haigus, siis tänapäevaks on avastatud terve rida faktoreid ja sündmusi, mis psoriaasi avaldumist soodustavad. Nendest on tähtsal kohal närvisüsteemi poolt initsieeritud reaktsioonide kaskaadid ning neid kaskaade käivitavad ja võimendavad interaktsioonid ehk neurogeense põletiku faktorid (Bos ja Rie, 1999).

Töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade naha ehitusest ja funktsioonist ning psoriaasi mõjust nahale. Samuti kirjeldatakse psoriaasi etioloogiat ja neuraalsete valkude rolli psoriaasi patogeneesis.

Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli lähemalt uurida psoriaasi patoloogiaga assotsieeritud muutusi närvikoe arhitektoonikas ja neuronaalsete valkude ekspressioonis, et hiljem tuvastada nende muutuste mehhanisme ja rolli psoriaasi patogeneesi korral.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Nahk

Nahk on mitmete oluliste funktsioonidega organ. Nende hulgast peamised on kaitsefunktsioon ehk füüsilise barjäärina ümbritseva keskkonna ja organismi vahel funktsioneerimine. Termoregulatsioonis osalevad nahas paiknevad mikrotsirkulatoorne verevoolusäng ja higinäärmed. Märkimisväärne on ka naha metaboolne roll näiteks D₃ provitamiini sünteesis (Mostafa ja Hegazy, 2015). Nahk on suure pindalaga organ, milles paikneb tohutul hulgal erinevaid retseptoreid, mis on tähtsad nii meie maailma aistingute kujunemisel, kui ka naha metabolismi regulatsioonis (Vallbo jt., 1995; Wessberg jt., 2003).

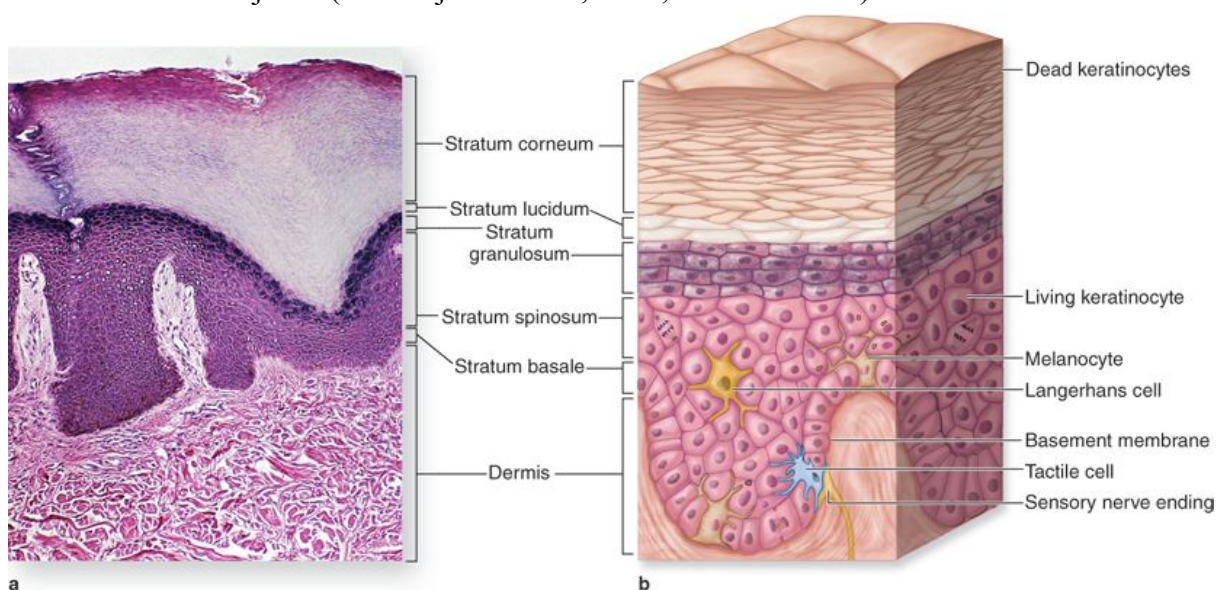
1.1.1. Naha histoloogiline ehitus

Inimesel on laias laastus kahte tüüpi nahka. Jalalaba ja peopesa piirkonnas olevat nahka nimetatakse paksuks nahaks. Sellel on paksem dermis ning puuduvad klassikalised naha derivaadid, nagu näiteks rasunäärmed ja karvad, aga esinevad ekkriinsed higinäärmed. Ülejäänud kehapiirkondades olev nahk on õhuke nahk, mis sisaldab karvu ja rasunäärmeid mis osalevad erinevates protsessides, nagu nt naha regeneratsioon (Levy jt., 2007), innervatsioon (Roberts ja Levitt, 1982), naha mikrobiota aktiivsuse ja koostise regulatsioon jms. Naha ehituses eristatakse kolme kihti: välimine on epidermis, selle all paikneb dermis ning alumine on rasvkude, mida nimetatakse hüpodermiseks (joonis 1). Hüpodermis ehk nahaaluskude on sidekoe tüüp, mis koosneb adipotsüüdidest, vere- ja lümfisoonetest, suurest kogusest immuunrakkudest. Hüpodermises paikneb higinäärmete glomerulaarne komponent (Mesher, 2016).

Dermis on troofilise funktsiooniga sidekude, mis jaotatakse ehituselt kaheks kihiks: ülemiseks papillaarseks ja alumiseks retikulaarseks dermiseks. Õhuke papillaarse kihi ekstratsellulaarne maatriks (ingl *extracellular matrix* – ECM) on hõredama struktuuriga ja sisaldab retikulaarse kihiga võrreldes rohkem veresooni. Dermise põhirakkudeks on fibroblastid, aga märkimisväärses koguses esineb ka teisi rakke, nagu näiteks histiotsüüdid (makrofaagid),

sileilihasrakud, aferentsete ja eferentsete neuronite aksonid, Schwann'i rakud ning mõned teised elemendid, nagu näärmete ja soonte epiteel (Brown ja Krishnamurthy, 2018).

Epidermis on mitmekihiline, sarvestuv, lameepiteel. Nagu iga epiteel, paikneb see basaalmembraanil, mille all paikneb juba papillaarne dermis. Epidermis koosneb viiest kihist. Basaalmembraanil paikneb *stratum basale*, selle peal on *stratum spinosum*, järgmine on *stratum granulosum* ning välimine on *stratum corneum*. Paksus nahas asub *s. granulosum*'i ja *s. corneum*'i vahel ka *stratum lucidum* (joonis 1). Kirjeldamise lihtsustamiseks eristatakse vahepeal ka *s. malpighi*'t, mis ühendab kaht sisemist epidermise kihti. Basaalne kiht on mitootiliselt aktiivne. Siin paiknevad keratinotsüütide populatsioonid on teiste rakukihtidega võrreldes vähem diferentseerunud. *S. spinosum*'i rakud produtseerivad aktiivselt tsütokeratiine ja desmosoomide komponente, millest moodustuvad tonofibrillid. Erinevate rakkude tonofibrillid on desmosoomide vahendusel omavahel kontaktis, mille tulemusena tekib oluline epidermise funktsiooni toetav struktuur. *S. Granulosum*'is toimub epidermise „skeleti“ tugevdamine filaggriiniga, aktiivne keratohüaliini süntees ning naha lipiidkesta moodustamine lipiidide eksotsütoosi teel. Viimane kiht koosneb umbes 15–20 kihist terminaalset diferentseerunud keratinotsüütidest ehk korneotsüütidest. Korneotsüüdid on surnud rakud, milles ei leitud normaalseid tuumasid ega teisi organelle ning mis sisaldavad tonofibrille, plasmalemmi ja tsütoplasma jääke. Selline jäik struktuur on piir, mis on normaalse intensiivsusega toimuva deskvamatsiooni tõttu ülematu nahal ja ümbritsevas keskkonnas elava mikrobiota jaoks (Honari ja Maibach, 2014; Mescher 2017).



Joonis 1. Terve paksu naha histoloogilise ehitus (a) ja selle skeem (b) (Mesher, 2016).

Veel üks nahas leiduv rakkude tüüp on melanotsüüdid. Need rakud paiknevad *s. basale* sees ning nende ülesandeks on toota melaniini ja transportida melaniiniga graanuleid keratinotsüütidesse, kus toimub melaniini sekvestratsioon. Melanotsüüdid on seotud basaalse membraaniga hemidesmosoomide kaudu, samas puuduvad neil klassikalised rakk-rakk kontaktid neid ümbritsevate keratinotsüütidega. Selle asemel esinevad melanotsüütidel ebaregulaarse kujuga jätked, mis invagineeruvad keskmiselt 5–10 keratinotsüüti, moodustades sel viisil epidermaalse melaniini ühiku. Histoloogilistes preparaatides on oluline neid eristada vahel äärmiselt sarnastest Merkeli rakkudest ning Langerhansi rakkudest. Langerhansi rakud on väga olulised antigeeni presenteeriva funktsiooniga histiotsüüdid, mis paiknevad reeglina *s. spinale* sees (Mescher 2017, Lin ja Fisher, 2007).

Närvisüsteemi ja naha interaktsioonide uurimise kontekstis on epidermis ja dermis olulised just seetõttu, et need kihid sisaldavad suures koguses spetsiifilisi mehhanoretseptoreid ja vabu närvilõpmeid, ehk neid elemente, mis võimaldavad informatsiooni ja aine liikumist kahe organsüsteemi vahel. Lihtsustatult võib nahas ärritajale vastuse kujunemist kirjeldada järgnevalt: nahas paiknevad aferentsete pseudounipolaarsete neuronite aksonite terminused reageerivad neid ümbritseva keskkonna muutustele, saadavad elektrilise signaali seljajju, kus toimub saadud informatsiooni edasine transport peajaju ja seljaaju eferentsetele neuronitele, mis tekitavad adekvaatse vastuse ärritajale. Erinevate retseptorite paiknemine on erinev. Vabad närvilõpmed paiknevad reeglina dermises ja *s. malpighi* sees, aga eriti tundlikes nahapiirkondades võivad ulatuda ka *s. granulosum*'i sisse. Vabad närvilõpmed moodustavad võrgustiku ka karvafolliikuli ning näärmete ümber, mis võimaldab nende töö moduleerimist. Vabu närvilõpmeid on mitut tüüpi ning nendel on kõige laiem funktsionaalne spekter. Nahas on kolm tüüpi sensoorseid närvilõpmeid. Nendest müeliniseerimata ja kõige peenem termo- ja notsitseptiivne on C-tüüp. A δ on müeliniseeritud katsu, termo- ja notsitseptorite tüüp. Kõige paksem müeliniseeritud mehhanore- ja notsitseptorite tüüp on A β . Merkeli rakud paiknevad basaalses kihis ja karvafolliikuli aksonite võrgustikus. Need on funktsionaalselt tihedalt seotud sensoorsete närvilõpmetega, moodustades rõhu ja puuteretseptori. *Pacini*, Meissneri ja Ruffini kehakesed on erinevad puute- ja baroretseptorid, mis paiknevad dermises (Reznik, 1996; Treede, 2003).

1.1.2 Naha homöostaatiline regeneratsioon

Epidermis on pidevalt ja autonoomselt regenereeruv naha kiht. See protsess peegeldub hästi epidermise ehituses ning selle kihtide koostises. Epidermise regeneratsiooni pidevus on oluline organismi enesekaitse element. Kõrvalekalded keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumise tasakaalust, mis lõpeb korneotsüütide sarvestumisega, on reeglina märke sellest, et toimub kas süsteemne või lokaalne (näiteks kontaktdermatiit) patoloogiline protsess. Selle põhjuseks on fakt, et epidermaalne regeneratsioon ehk keratinotsüütide proliferatsioon ja diferentseerumine on reguleeritud paljude mehhanismide poolt, sealhulgas auto-, para- ja neurokriinselt. Naha ekvivalentidega *in vitro* läbi viidud eksperimendis näidati, et epidermise regeneratsiooniks on vaja dermise elementide osalemist (Boehnke jt., 2007). Märkimisväärne roll on fibroblastidel, mille proliferatsioon sõltub epidermise rakkude poolt sünteesitud kasvufaktoritest, neist olulisimad on transformeeriv kasvufaktor beta (ingl *transforming growth factor beta* – TGF- β) ja peamine fibroblastide kasvufaktor (ingl *basic fibroblast growth factor* – bFGF). Ilma nende kasvufaktoriteta epidermis naha ekvivalentides *in vitro* ei arenenud või tekkis atroofiline epidermis. Seejuures piisas normaalse epidermise arenguks väga väikesest fibroblastide kogusest. Antud eksperiment kirjeldab positiivset tagasisidet, mille korral epidermis toodab kasvufaktoreid, mis stimuleerides fibroblaste, toetab omakorda mikrokeskkonda, milles keratinotsüüdid on võimelised iseennast produtseerima ning diferentseeruma (El - Ghalbzouri jt., 2002).

Teine oluline epidermise homöostaasi regulaator, mida kirjeldatakse selles töös põhjalikumalt allpool, on perifeerne närvisüsteem, mille roll on põhjalikult uuritud mitmete patoloogiate juhul, kaasa arvates psoriaas.

1.1.3. Naha regeneratsioon kahjustuse korral

Kui naha kahjustuse korral ei ole basaalmembraan kannatada saanud, toimub regeneratsioon kiiresti ning sarnaselt homöostaatilise regeneratsiooni mehhanismiga. Sügavamad traumad, mis lõhuvad basaalmembraani ning ulatuvad dermiseni, käivitavad põhjalikult uuritud reaktsioonide kaskaadi, mis tavaliselt jaotakse neljaks ajas kattuvaks staadiumiks.

Esimene ja kõige kiirem staadium on hemostaas, mille jooksul kujuneb välja trombotsüütide agregatsiooni ja verehüübimisfaktorite kaskaadi toime fibrini ja trombotsüütide rikas tromb, mis peatab verejooksu ning muutub kemokiinide ning mõnede kasvufaktorite produktsiooni tsentriks. Paralleelselt koaguleerimisreaktsiooniga toimub lokaalne vasokonstriksioon koos kapillaaride läbilaskevõime suurenemisega. Kogu eelnevalt kirjeldatud protsess on oluline ka selleks, et peatada potentsiaalsete patogeenide levimine haava kaudu organismi. Hiljem, umbes tunni jooksul, migreeruvad polümorfonukleaarsed leukotsüüdid, monotsüüdid ja makrofaagid kahjustuse kohale ning pääsevad ekstravasatsiooni teel kahjustatud piirkonda, kus algavad põletikulised protsessid. (Velnar jt., 2009)

Reeglina lõpeb aktiivne põletiku faas paari päeva jooksul, kui fagotsüüdid puhastavad haava ümbruse patogeenidest ning organismi oma rakkude jäänukitest. Edasi toimuvast mõõdukas põletikus on valdavad makrofaagid. Sellest momendist alates väheneb põletiku regioonis neutrofiilide hulk pidevalt fagotsütoosi teel (Hübner jt., 1996). Dermise ja epidermise aktiveeritud rakud migreeruvad haava piirkonda, mis tähendab uue proliferatsiooni ja regeneratsiooni faasi algust. Selles faasis toimuvad fibroplasia, angiogenees ja reepitelisatsioon, lõpuks moodustub arm. Fibroblastid paljunevad aktiivselt haava piirkonnas ning produtseerivad ECM komponente. Osa fibroblastidest diferentseerub müofibroblastideks, mis fenotüübilt sarnanevad nii fibroblastide, kui ka silelihasrakkudega. Müofibroblastide peamine funktsioon, lisaks matriksi komponentide produktsioonile, on haava mõõtmete vähendamine, kontraheerudes pärast haava servadega seostumist (Welch jt., 1990). Basaalse kihi keratinotsüüdid kaotavad tänu matriksi metalloproteinaaside ekspressioonile seose basaalmembraani ja teineteisega ning migreeruvad haava piirkonda, tootes samal ajal basaalmembraani komponente. Teine oluline mittediferentseeritud keratinotsüütide allikas on karvafoliikuli kumerus ehk *bulge* (Fuchs, 2008). Proliferatsiooni faas lõpeb siis, kui basaalmembraan on taastunud ning kattunud keratinotsüütidega. Reeglina lõpeb kogu protsess umbes kahe-kolme nädalaga. Sõltuvalt paljudest ekso- ja endogeestest faktoritest (haava suurus, sekundaarsed infektsioonid, diabeet, dermatosiid jpm) võib see protsess olla ka märkimisväärselt pikem või lõppeda hoopis kroonilise põletikuga (Chen jt., 2007).

Viimane, kõige pikem faas on modelleerimise faas. Mitme aasta jooksul toimub epidermise struktuuri taastumine, pidev ECM paigutuse ja koostise reorganiseerumine ning üleliigsete,

veresoonte ja rakkude elimineerimine. Selle protsessi käigus taastab uus tekkinud kude järk-järgult terve koe funktsionaalseid omadusi. Higinäärmete ja karvafolliikulite taastumist tüüpiliselt ei toimu, kuid mõnedel indiviididel on siiski täheldatud karvafolliikuli regeneratsiooni (Osaka jt., 2007).

Nimetatud protsessid on reguleeritud paljude signaalmolekulide poolt. Neuropeptiidid ja neurotrofiinid osalevad samuti kõikide etappide moduleerimises (Cheret jt., 2013).

1.2 Psoriaas

Psoriaas on mitmekesise etioloogiaga levinud dermatoos, mille esinemissagedus maailmas on umbes 2%, kuid mõnedes piirkondades ületab 10%. Tänapäeval enim aktsepteeritud arusaama kohaselt on psoriaas immuunvahendatud haigus, mille tüüp, kulgemine ning initsieerimise mehhanism sõltub paljudest ekso- ja endogeensetest faktoritest. Eksogeensete faktorite hulka kuuluvad mõned ravimid, nagu näiteks imikvimood (Fits jt., 2009), keemilised ärritajad ja nahatraumad (Koebneri fenomen). Väidetavalt võivad psoriaasi tekitada ning selle kulgu raskendada mõned bakteriaalsed, seen- ja viirusinfektsioonid (Fry ja Baker, 2007). Inimese immuunpuudulikkuse viirus (ingl *human immunodeficiency virus* – HIV) omab paradoksaalset toimet. Psoriaas võib esimest korda tekkida või teravneda pärast HIV-ga infitseerimist. Seda seletatakse düsreguleeritud T-rakkude aktiivsusega (Morar jt., 2010). Märkimisväärset rolli psoriaasi kulgemises mängib kliima. Külmem ja kuivem õhk raskendab haiguse kulgu, seevastu päikese kiirgus vähendab suuremal osal psoriaasahaigetel haigussümptomeid ja seetõttu on fototeraapia üks efektiivsetest standardsetest psoriaasi ravimeetoditest (Hönigsmann, 2002; Parrish ja Jaenicke, 1981).

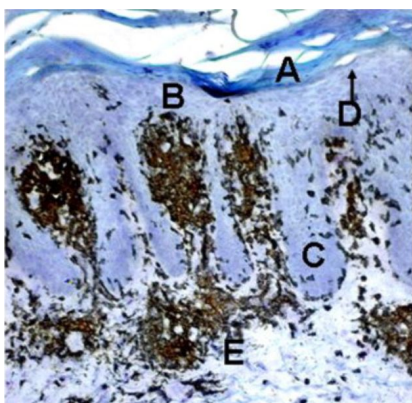
Endogeensete faktorite hulgast tuuakse välja pärilikkus. Psoriaasi diagnoositakse 3 korda rohkem monosügootsetel kaksikutel võrreldes erimunakaksikutega (Farber ja Nall, 1998). Lisaks sellele on ka üldine organismi seisund, hormonaalsed muutused, füsioloogiline ja psüühiline stress ning puberteet olulise tähendusega. Umbes kolmandikul psoriaasi põdevatest patsientidest tekivad sümptomid 15-25 eluaasta vahel. Selles kontekstis on oluline mainida, et esineb märkimisväärne seos psoriaasi ja depressiooni vahel. Kuna uuringud (Akay jt., 2002 ; Esposito jt., 2006) näitasid, et umbes 60% psoriaasi põdevatest inimestest (kontrollrühmas umbes 20%) kogesid depressiooni sümptomeid või stressi enne psoriaasisümptomite

tugevnemist (Pacan jt., 2003), võib eeldada, et närvisüsteem on üks olulistest psoriaasi kulgu määravatest komponentidest.

Vaatamata sellele, et enamasti on psoriaasi sümptomid seotud nahakaebustega ja epidermise derivaatidega, ei tohi unustada, et tegu on süsteemse haigusega. Üks hea näide selle kinnituseks on psoriaatiline artriit ehk psoriaatiline artropaatia. Psoriaatiline artriit on seni määramata etioloogiaga liigeste põletik, mis tekib umbes kolmandikul psoriaasi põdevatest inimestest (Scara jt., 1984), ning mille esinemissagedus on vähemalt 10 korda kõrgem, kui populatsiooni keskmine ükskõik millise teise etioloogiaga artriidi korral (Gladman, 2005; Moll ja Wright, 1973). Enamasti eelnevad naha sümptomid artriidile, aga ka vastupidine situatsioon ei ole erandlik (umbes 20% juhtudest). Seega psoriaatiline artropaatia on tihti esinev psoriaasi komplikatsioon ning psoriaas ise süsteemne haigus. Ka mõned teised põletikulised protsessid, nagu näiteks entesiit ja küünne inflamatsioon, on seotud psoriaasiga, aga neid seisundeid on märkimisväärselt vähem uuritud (McGonagle, 2009). Tänapäeval on teada, et sellised patoloogilised seisundid nagu näiteks nahavähk (Boffetta jt., 2001), Crohn'i tõbi (Najarian ja Gottlieb, 2003) ning kardiovaskulaarsed haigused (Miller jt., 2013), on võrreldes terve populatsiooniga psoriaasi põdevate inimeste seas enam levinud, kuid nende seoste mehhanisme pole senini täpsemalt uuritud.

1.2.1. Psoriaatilise naha histopatoloogia

Kuigi universaalseid morfoloogilisi ja molekulaarseid markerid pole siiani tuvastatud, on psoriaasipatsientidelt pärit biopsiatel siiski rida ühiseid histoloogilisi tunnuseid (Raychaudhuri jt., 2014).



Joonis 2. Hematoksüliiniga ja anti-CD3 antikehaga värvitud psoriaatilise naha preparaat (Raychaudhuri jt., 2014).

Esimene silmatorkav tunnus psoriaasi proovidest valmistatud nahalõikudel on epidermise struktuuri muutused. *Stratum corneum*'i rakkudes, erinevalt kliiniliselt tervest nahast, on mõnikord võimalik näha tuumasid ehk parakeratoosi (joonis 2, A). Samuti on epidermise kuju eriline: epidermaalsed papillid on märkimisväärsel pikemad (joonis 2, C) ning epidermis üldiselt on samuti paksem (joonis 2, B). Viimane tüüpiline psoriaatilise epidermise tunnus on *stratum granulosum*'i kas hüpo- või aplaasia (joonis 2, D). Kõik need tunnused on tingitud keratinotsüütide tüvirakkude (ingl *keratinocyte stemcell* – KSC) hüperprolifereerumisest ja ebanormaalsest diferentseerumisest, mis võib olla põhjustatud mitmete neid protsesse reguleerivate mehhanismide ebakorrektselt reguleeritusest. Hetkel ei ole päris selge, mis toimub psoriaatilises nahas Langerhansi rakkudega ning milline on nende roll haiguse patogeneesis. Samas on leitud, et ka Langerhansi rakkude funktsioon on tugevalt häiritud nende piiratud migratsioonivõime tõttu (Cumberbatch jt., 2006). Psoriaatilise laigu dermises ja epidermises leidub laiguvälise ning terve nahaga võrreldes rohkelt sensoorseid närvikiude, milles leidub kaltsitoniini geeni sugulaspeptiidi (ingl *calcitonin gene-related peptide* – CGRP) ning vasoaktiivset intestinaalset peptiidi (ingl *vasoactive intestinal peptide* – VIP) ja SP neuropeptiide (Chan jt., 1997).

Psoriaatilise naha dermise koostis on samuti võrreldes terve nahaga muutunud. Papillaarse dermise suurenenud veresoontega varustatuse aste on psoriaasi korral tüüpiline ning see on positiivses korrelatsioonis haiguse kulgemise raskusega (Heidenreich jt., 2009). Lisaks toimub immuunrakkude, peamiselt T-rakkude erinevate alampopulatsioonide, infiltratsioon (joonis 2, E) ning samuti on mastotsüütide kogus psoriaatilises nahas võrreldes kontrolliga tavaliselt suurem (Jiang jt., 2001).

1.2.2. Nahatraumad psoriaasi kontekstis

Mõned, nii endogeenset kui ka eksogeenset päritolu, faktorid takistavad normaalset haava regeneratsiooni protsessi. Siia hulka kuuluvad näiteks patogeensete mikroorganismide aktiivsus, erineva etioloogiaga vaskuliidid, veresoonte okklusioonid ning samuti tuumorite väljakujunemine. Kõik need protsessid võivad muuta haava paranemise protsessi krooniliseks ning viia edasiste haiguste tekkimiseni (Stadelmann jt., 1998).

Nahahaavade regeneratsiooni psoriaasi protsessis on oluline uurida mitmel põhjustel. Esiteks põhjustab psoriaasiga seotud sügelemine haavade moodustamist tänu katki kratsimisele, mis omakorda suurendab sekundaarsete infektsioonide riski. Umbes poolte pustuloosse psoriaasi juhtumite korral on pustulitest isoleeritud need bakterid, mis tüüpiliselt on isoleeritavad ka naha abstsessidest. Need on näiteks *S. aureus*, *Peptostreptococcus sp*, *E. coli*, Grupp D *Enterococcus*, Grupp A *Streptococcus* ning mõned teised, kokku 36 isolaati. (Brook jt., 2001).

Samas on sekundaarsed infektsioonid psoriaasi puhul suhteliselt harv nähtus. Tüüpiliselt on psoriaasilaigud asümptomaatiliselt kandja jaoks koloniseeritud normaalse naha mikrobiota hulka kuuluvate bakteriliikidega. Reeglina on psoriaatilises nahas terve nahaga võrreldes, ka laigu piirkonnas, bakterite hulk suurem (Singh ja Rao, 1978). Payne (1967) kirjeldab juhtumit kus kollagenaas-positiivsed *S. aureus*'e bakterid, mis olid pärit psoriaasi põdeva anestesiologi kätel olevatest laikudest, põhjustasid 33-st nakatunust 4 patsiendi surma.

Üks tõestatud psoriaasi kaitsemehhanism on tsütotoksiliste T-rakkude migratsioon psoriaatilise laigu piirkonna dermise papillaarsesse kihti, kus nad produtseerivad laia antibakteriaalse toimespektriga peptiidi - granulüsiini (Raychaudhuri jt., 2004). Teine faktor, mis kaitseb psoriaatilist nahka patogeenide eest, on suurenenud beeta-defensiini produktsioon keratinotsüütide poolt, millel on Gram-negatiivsete bakterite ja mõnede seente, näiteks *Candida sp*, vastane mõju (Harder jt., 1997). Närvisüsteem võib seevastu mängida teatud rolli põletiku moduleerimises, inhibeerides antigeeni presentatsiooni Th1 rakudele hüperprodutseeritud CGRP kaudu (Hosoi jt., 1993; Asahina jt., 1995). Samas on näidatud (Ding jt., 2016) CGRP võimendav toime Th17 rakkude populatsioonile, millel on tõestatud roll psoriaasi patogeneesis.

Viimase kümnendi jooksul on ilmunud rida uurimustöid mikroobse endokrinoloogiaga tegelevatelt töögruppidele, mis heidavad valgust närvisüsteemi ja naha mikrobioomi seostele. Substants P (SP) ning CGRP suurendavad nii Gram positiivsete (*S. aureus* ja *S. epidermidis* näitel), kui ka Gram negatiivsete (*B. cereus* näitel) bakterite virulentsust, aktiveerides adhesioonifaktorite, superoksiidi dismutaasi ja kollagenaasi ekspressiooni (Mijouin jt., 2013 ; N'Diaye jt., 2017). SP, CGRP ning mõnede teiste neuropeptiidide ekspressioon võib järsult muutuda nii füsioloogilise kui ka psühholoogilise stressi puhul, mis viitab sellele et naha

homöostaas on keerukalt reguleeritud närvisüsteemi poolt ning naha mõned patoloogilised seisundid võivad olla põhjustatud muutustega närvisüsteemis. Üks hiirtega läbi viidud katsetes kirjeldatud mehhanism, mis võib aset leida ka psoriaasi puhul, on mastotsüütide migratsiooni ja küpsemise stimuleerimine naha mikrobioomi poolt. Gram-positiivsete bakterite liikide rakukesta komponent lipoteihhuaat on võimeline initsieerima tüvirakkude faktori (ingl *stem cell factor* – SCF) produktsiooni keratinotsüütides. SCF on kemokiin, mis interakteerudes mastotsüütidel ekspresseeritud c-Kit retseptoritega soodustab nende migratsiooni ja diferentseerumist. Kuna psoriaatilised laigud on rikkalikult koloniseeritud Gram positiivsete bakteritega on see potentsiaalselt võimalik patogeneesi mehhanism (Wang jt., 2017).

Lisaks on väidetud, et haava regeneratsiooni protsessi tasakaalu muutumine, võib samuti olla oluline osa psoriaasi patogeneesist (Morhenn, 2018). 19. sajandil avastas H. Koebner, et pindmine terve naha trauma psoriaasi põdeval indiviidil põhjustab trauma spetsiifilise kujuga psoriaasilaigu teket. Praeguseks on teada, et mõned teised dermatoosid, nagu näiteks *lichen planus*, on seotud koebnerisatsiooni reaktsiooniga, mida on võimalik kasutada provokatiivse testina. Üldiselt on täheldatud, et immuunsupressiivne ravi ning fototeraapia on positiivses korrelatsioonis koebnerisatsiooniga. Lisaks sellele ei mõjuta tsütostaatilised ravimid (metotreksaat, kolhitsiin) Koebneri fenomeni esinemist. Samuti eeldatakse, et psoriaasi akuutses faasis on koebnerisatsioon tõenäolisem kui remissiooni faasis, mis võib viidata, et koebnerisatsiooni reaktsioon initsieeritakse neuropeptiidide poolt. Kui selle teooria põhimõte on õige, siis on ka loogiline, et aksoniterikkamas akuutse faasi nahas on Koebneri fenomen tõenäolisem, kui neuronitevaeses remissioonifaasis. Psoriaasiga assotsieeritud koebneri reaktsioon võib areneda neljal viisil. Esiteks ei pruugi Koebneri fenomeni tekkida ehk naha trauma paraneb nii, nagu varem on juba kirjeldatud. Teisel juhul võib reaktsioon olla tugev ning täielikult kattuda trauma piirkonnaga. Minimaalse reaktsiooni korral areneb psoriaasi laik vaid trauma piirkonna teatud osal. Abortiivne Koebneri reaktsioon meenutab algselt psoriaasi laigu arengut, kuid umbes 2–3 nädalaga lõpeb kliiniliselt terve naha fenotüübi taastumisega. Hetkel pole päris selge, kuidas Koebneri fenomeni tugevus korreleerib psoriaasi sümptomite intensiivsusega (Weiss jt., 2002).

1.2.3. Psoriaasi klassifikatsioon ja morfoloogia

Tänapäeval puuduvad unifitseeritud psoriaasi molekulaarsed markerid ning histoloogiline naha biopsia uuring on ebameeldiv, ei ole alati ammendav ning ühetähenduslik meetod diagnoosi panemiseks. Seetõttu on psoriaasi diagnoosimisel hetkel kõige tähtsam psoriaatilise piirkonna morfoloogiline uuring. Kahjuks ei ole see meetod psoriaasi väga laia sümptomite spektri tõttu piisavalt spetsiifiline ja tundlik. Tihti võivad sümptomid nõrgema haiguse kulu korral, näiteks ketendus ning raskesti märgatavad laigud küünarnuki piirkonnas, jääda märkamata nii haige kui ka arsti poolt (Borda ja Wikramanayake, 2015). Lisaks sellele võivad mõned teised naha patoloogilised seisundid segi minna teatud psoriaasi vormidega (Tuzun jt., 2016). Vale diagnoos võib mõjutada ravi ja uuringute kvaliteeti, seetõttu võib väita, et psoriaasi geneetiliste ning molekulaarsete markerite tuvastamine ning kindlate testsüsteemide välja arendamine peaks olema tänapäeval prioriteediks.

Psoriaasi fenotüübi määramisel on olulised selle anatoomiline ning funktsionaalne lokalisatsioon, laigu morfoloogia ja arengustaadium. Teised potentsiaalselt olulised kriteeriumid on haiguse ilmnemise vanus ning nakatunud naha osakaal. (Raychaudhuri jt., 2014; Griffiths jt., 2007).



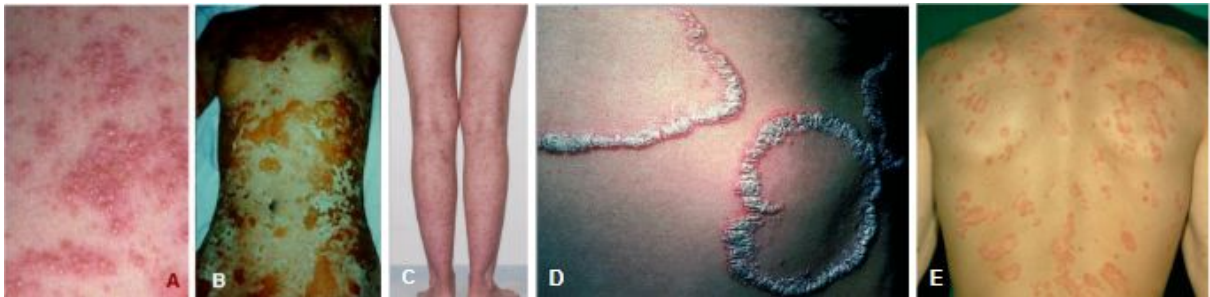
Joonis 3. *Psoriasis vulgaris* lokaliseeritud (A), stabiilne (B), ebastabiilne (C) ja erüthrodermiline (D) vorm (Raychaudhuri jt., 2014).

Psoriasis vulgaris ehk laiguline mittepustuloosne psoriaas on enim levinud psoriaasi vorm, mis jaotakse neljaks peamiseks alatüübiks (Levine ja Gottlieb, 2009).

Lokaliseeritud *psoriasis vulgaris* (joonis 3A) on üks kõige sagedasem psoriaasi vorm. Stabiilne, sümmeetriliselt levinud *psoriasis vulgaris* (joonis 3B) ja ebastabiilne ehk progresseeruv *psoriasis vulgaris* (joonis 3C) on raskema kuluga psoriaasi vormid. Kõige raskem, samas haruldane, mitte-pustuloosse psoriaasi vorm, mis tekib tüüpiliselt adekvaatse

ravi puudumisel või vastusena teatud medikamentidele (näiteks kortikosteroididele), on erütrodermiline *psoriasis vulgaris* (joonis 3D). Erütrodermiline psoriaas katab sageli patsiendi kogu nahapinna ning hävitab sellega nahabarjääri kaitsefunktsiooni, mis võib põhjustada sepsist. Seega on erütrodermiline psoriaasi vorm potentsiaalselt eluohtlik seisund. (Okoduwa jt., 2009)

Ärritavad ained, psoriaasiga kokkusobimatud ravimid, rasedus, infektsioonid ning mõned teised faktorid raskendavad *psoriasis vulgaris*'e kulgu, mille tulemusena võivad tekkida psoriaasi lokaalne ja generaliseeritud tilkpsoriaasi (*guttate psoriasis*) ning pustuloosne vorm. Vahepeal tekivad need vormid sõltumatult *psoriasis vulgaris*'est (Reynolds jt., 2007). Üldjuhul moodustavad pustuloossed vormid umbes kümnendiku kõikidest psoriaasi juhtumitest (Menter jt., 2008).



Joonis 4. Lokalisseritud (A) ja generaliseeritud (B) pustuloosse ning tilkpsoriaasi (C) vormid. Nii pustuloosne (D) kui ka *psoriasis vulgaris* (E) võivad moodustada rõngalisi laike ehk muutuda annulaarseks psoriaasiks (Raychaudhuri jt., 2014; Griffiths jt., 2007; Bos ja Rie, 1999).

Pustuloosse psoriaasi vorm algab sellest, et tekivad lokaalselt väikesed, mädaga täidetud põiekesed ehk pustulid (joonis 4A) (Raychaudhuri jt., 2014). Kõige sagedamini esineb pustulooset psoriaasi jalataldadel ja peopesades. Hiljem võivad pustulid generaliseeruda ning ühinedes moodustada suuremaid klastreid (joonis 4B). Seevastu tilkpsoriaasi puhul (joonis 4C) psoriaasi laigud, dissemineerudes nahal, säilitavad oma väikese suuruse. Selle vormi erosiooni või pustuli diameeter ei ületa tavaliselt 1 cm ning see on, sarnaselt pustuloosse psoriaasiga, põhjustatud bakteriaalsest infektsioonist (Griffiths jt., 2007).

Märkimisväärne on ka harvaesinev annulaarne ehk rõngasjas psoriaasi vorm (Liao jt., 2002). Rõngas võib tekkida, nii pustuloosse (joonis 4D), kui ka *psoriasis vulgaris* (joonis 4E) laigust. See on võimalik tänu sellele, et paralleelselt laigu laienemisega hakkab laigu sisemises osas toimuma remissiooni faas. Sellele järgneb sisemise osa muutumine kliiniliselt normaalseks

nahaks. Täpsem annulaarse psoriaasi etioloogia ja patogeneesi on hetkel teadmata (Bos ja Rie, 1999).

1.2.4. Psoriaasi etioloogia hüpoteesid

Tänapäeval on võimalik leida väga palju uurimustöid, mis on pühendatud ühe konkreetse psoriaasi etioloogia ja patogeneesi hüpoteesi uurimisele, ning ainult väike osa töödest kirjeldab psoriaasi multifaktoriaalset etioloogiat. Seetõttu on käesolevas peatükis püütud lihtsustatult näidata psoriaasi etiopatogeneesi jaoks olulisi interaktsioone ning närvisüsteemi keerukat rolli psoriaasis.

Nagu eespool mainitud, on mikroorganismid üks psoriaasi kulgu määravatest faktoritest. Seetõttu on palju uuritud psoriaasi ja soole mikrobioomi seoseid. Siiani puudub konsensus, kas peensoole põletikulised protsessid on psoriaasi põhjus, tagajärg või puudub spetsiifiline seos nende vahel hoopis. Küll aga on leitud, et psoriaasi põdevatel inimestel on soole läbilaskevõime kontrollgrupiga võrreldes suurem (Humbert jt., 1991). See võib omakorda olla põhjuseks kroonilisele intoksikatsioonile, mis sarnaselt mõnede teiste haigustega peegeldub nahal. Sellise informatsiooni valguses tundub olevat loogiline, et soole põletikulised protsessid on psoriaatikute seas levinud (Yates jt., 1982). Samuti on mõnedel inimestel pärast dialüüsi kirjeldatud spontaanset psoriaasi remissiooni (McEvoy ja Kelly, 1976). Vaatamata sellele, et 1976 aastast alates on kirjeldatud mitmeid juhtumeid, kus peritonaalse ja hemodialüüsi tagajärjel paraneti psoriaasist, pole selle meetodi efektiivsust kunagi lähemalt uuritud ning selle tähtsus on tänapäeval tühine (Pratsinis jt., 2018), kuna dialüüs on võrreldes standartsete ravimeetoditega palju keerulisem (Whittier jt., 1983; Murphy ja Reich, 2011). Märkimisväärne on ka fakt, et enamikel juhtudel oli dialüüs efektiivne raskemate psoriaasivormide puhul. Lisaks sellele on näidatud (Wang jt., 2018), et psoriaasi haigestumine on tõenäolisem neerupuudulikkusega inimeste seas. Kokkuvõtvalt võib väita, et dialüüsil on võimalik kahetine toimemehhanism. Esiteks, see võib elimineerida verest seni määramatu endotoksiini, superantigeeni või immuunkompleksi. Teiseks võib dialüüs elimineerida immunotsüüte (Gliński, 1979), mis viib spontaansele remissioonile või kergendab psoriaasi kulgu osaliselt (Halevy jt., 1979). Selle informatsiooni taustal võib üheks võimalikuks psoriaasi tekke mehhanismiks olla mittespetsiifiline T-rakkude aktivatsioon superantigeeni (sAg) poolt. Vaatamata sellele, et soole mikrobioota on oma arvukuse ja liigirikkuse tõttu

potentsiaalselt oluline nende antigeenide allikas, ei ole ta ainumäärava toimega. Yarwood (2000) on näidanud, et mõnede *Streptococcus* ja *Staphylococcus* liikide poolt produtseeritud sAg on võimeline aktiveerima neid lümfotsüüte, mis reageerivad autoantigeenidele nahas, põhjustades psoriaasi. Kirjeldatud on, et aktiveerimise protsess võib alata lokaalselt nahast, näiteks epidermises esinevate antigeene presenteerivate rakkude osalemisel, kui ka sarnaselt soole hüpoteesi mehhanismiga, näiteks tonsilliidist. Märkimisväärne on tähelepanek, et vastava infektsiooni elimineerimine antibiootilise või operatiivse raviga võib viia ka psoriaasist lahti saamiseni (Garritsen jt., 2017; McMillin jt., 1999). Seejuures on operatsiooni edukus maksimaalne HLA-Cw6 homosügootidel (Thorleifsdottir jt., 2016), kellel on ka suurem tõenäosus saada nakatud *Streptococcus* liikide ja psoriaasiga (Jesús-Gil jt., 2018; Stawczyk-Macieja jt., 2018).

Tänapäeval ei ole määratud kindlat psoriaasi induktsioonis osalevat autoaingeeni ja märklaud-rakke. Samuti on suhteliselt vähe informatsiooni humoraalse immuunsuse rolli kohta psoriaasi etiopatoloogias, samas on leitud mitmed valgud, mille vastu psoriaasi puhul tekivad antikehad. Seroloogiliste meetoditega on tuvastatud, et psoriaasi ja selle sümptomite tugevusega korreleerub suurenenud antikehade, eriti IgA, üldproduktsioon. B-rakkude muutunud aktiivsus võib samuti osaleda psoriaasi patogeneesis, kuid need rakud ei ole psoriaasi patogeneesis obligatoorsed (Thomas jt., 2019; Dass jt., 2007). Peab märkima, et selle teema uuringute tulemused on siiani väga vastuolulised, mis võib olla põhjustatud sellest, et humoraalne immuunsus tekib sekundaarselt pärast psoriaasi sümptomite tugevnemist (Chularojanamontri jt., 2018).

Katelitsidiin ja ADAMTSL5 on rohkem uuritud endogeensed valgud, mille vastu on tuvastatud IgG produktsioon (Lande jt., 2014; Yuan jt., 2019). Katelitsidiin on väike, positiivse laenguga antimikroobne peptiid, mida ekspresseerivad keratinotsüüdid ja fagotsüüdid vastuseks proinflammatoorsetele faktoritele, nagu näideks TNF- α ehk kaheksiin. Psoriaatilise naha epidermise hüperplaasia, mastotsüütide degranulatsioon ja immuunrakkude infiltratsioon viib katelitsidiini hüperekspressioonile, mis omakorda põhjustab patoloogilist Th, Tc ning potentsiaalselt B-rakkude aktivatsiooni antigeeni presentatsiooni teel Langerhansi rakkudega, mis ongi üks psoriaasi patogeneesi mehhanism. ADAMTSL5 on ekspresseeritud melanotsüütides, keratinotsüütides ja immuunrakkudes. See on sekreteeritav valk, mis on

võimeline aktiveerima autoagresiivseid T-rakke, HLA-C*06:02 alleeli kandjatel (Strassner jt., 2016; Fuentes - Duculan jt., 2017).

Üks ebatavaline näide antikehade rollist psoriaasi patogeneesis on gluteeni koostisesse kuuluva gliadiini vastane immuunsus. Psoriaasi põdevate inimeste seerumis, sarnaselt herpetiformse dermatiidi ning tsöliaakiaga, on leitud kontrolliga võrreldes kõrgem anti-Gliadiin IgG4 (Qiu jt., 2019) ja IgA (Damasiewicz - Bodzek ja Wielkoszyński, 2008) tiiter, mis on selges korrelatsioonis psoriaasi sümptomite tugevusega. Veelgi enam, anti-Gliadiin IgE on üks atoopilise dermatiidi põhjustajatest (Varjonen jt., 2008). Vaatamata sellele, et seropositiivsete psoriaasi haigete seas on levinud gluteenivaba dieet, mis on efektiivne psoriaasi profülaktika (Michaëlsson jt., 2001; Wu ja Weinberg, 2019), võib siiski eeldada, et immunokompleksid ning ristreaktsioonid on vaid haruldastel juhtudel psoriaasi põhjuseks (Gliński, 1979; Thomas jt., 2019). Kuigi ei ole võimalik täpsemalt määrata, kas gliadiini vastane Ig ning sooletega seotud sümptomid on psoriaasi põhjus või tagajärg, viitab see kaudselt soole patoloogiate ja psoriaasi seosele.

Juba ammu on märgatud psoriaasi põdevate inimeste seas levivat lipiidse metabolismi anomaaliat, kuid alles viimasel ajal on hakatud uurima lipiidide olulisust psoriaasi patogeneesis. Mastotsüütide poolt eksosoomides sekreteeritud fosfolipaas A2 grupp 4D (ingl *phospholipase A2 Group IVD – PLA2G4D*) pääsedes antigeeni presenteerivasse rakku (ingl *antigen-presenting cell – APC*), lagundab lipiide, genereerides lipiidseid neoantigene. Need lipiidsed neoantigenid eksponeeritult kompleksis CD1a retseptoriga APC peal käivitavad T-rakkude aktivatsiooni. Tulemuseks on proinflammatoorsete tsütokiinide produktsioon, mis on oluline osa psoriaasi initsieerivate reaktsioonide kaskaadist. Samas uuringus on näidatud, et PLA2G4D paikneb ka ekstratselullaarselt dermises, mis võib olla psoriaasi soodustavaks faktoriks. Sel juhul, võivad analoogset ensüümi sekreteerivad mikroorganismid olla samuti psoriaasi soodustav faktor. (Mallbris jt., 2006; Cheung jt., 2016)

Lümfotsüütide olulisust psoriaasi etioloogias ja patogeneesis on lihtne illustreerida standardse immunsupressiivse ravi efektiivsusega. Tsüklosporiin ja FK506 (Maza jt., 2011), metotreksaat (Geel jt., 2015), foto- ja fotokeemiline teraapia ja steroidravi on tüüpilised psoriaasi ravivõimalused, mille efektiivsusega kasutatavad ravimid (Choi jt., 2016). Radikaalne immuunsupressioon võib olla kahjulik juhul, kui psoriaasi põdeval isikul on teisi kroonilisi haigusi, nagu näiteks

viirushepatiit, HPV (ingl *human papillomavirus*) ja HIV infektsioon jms eriti, kui kaasnev haigus on akuutses faasis. Selles situatsioonis kasutati edukalt kaheksiini inhibiitoreid, näiteks *etanercepti* (Kaushik ja Lebwohl, 2018).

Nagu eelpool mainitud on stress ja depressiivne seisund korrelatsioonis psoriaasi kulu raskusega ning võimelised initsieerima psoriaatilise laigu teket. Näitlikumalt saab närvisüsteemi ja psoriaasi vahelist seost illustreerida mõnede kliiniliste juhtumitega. milles psoriaasi põdeval patsiendil tekkis lokaalne ja täielik remissioon pärast vastava neuroni traumaatilist aksotoomiat ning sümptomite taastumine pärast aksoni regeneratsiooni (Joseph jt., 2005). Kirjeldatakse ka juhtumeid, kus psoriaasi põdeval inimesel tekkis närvitrauma korral spetsiifilise kujuga närvitee projektsiooni moodustav psoriaasilaik (Galluzzo jt., 2015). Kuigi taolisi juhtumeid on kirjeldatud suhteliselt vähe ei ole need erandiks (Zhu jt., 2016). Uuringud näitavad, et neuromodulaatorid, eriti A-tüüpi botuliini neurotoksiin, on väga efektiivsed psoriaasi ravivahendid (Todberg jt., 2017; Zanchi jt., 2008). Selle toime enam uuritud mehhanismiks on lokaalne perifeerse närvisüsteemi sekretoorse aktiivsuse inhibeerimine. Psoriaasilaigus on sensoorsete närvide tihedus võrreldes kliiniliselt terve nahaga märkimisväärselt kõrgem ning nende ekspressiooniprofiil erineb tervest nahast (Naukkarinen jt., 1989). Lisaks sellele viitab sümmeetriline laikude jaotumine nahal närvisüsteemi olulisele rollile psoriaasi etioloogias. Kõik need faktid on aluseks juba pikalt ja aktiivselt uuritava neurogeense põletiku hüpoteesile (Farber jt., 1986; Sandoval-Talamantes jt., 2020).

Substants P (SP) on esimene neuropeptiid, mida seostati psoriaasiga. See on undekapeptiid, mida produtseerivad, enamasti, sensoorsed A δ ja C närvikiud. Madalamal tasemel ning vastuseks teatud signaalidele suudavad seda toota ka teised naha komponendid (Lotti jt., 2002; Liu jt., 2006). SP, nagu kõik teised neuropeptiidid, pääseb dermise, epidermise ja näärmete sekreedi sisse eferentsete aksonite terminaalidest eksotsütoosi teel. Neuropeptiidid kuuluvad neurotransmitterite hulka, kuid lisaks on neil ka para- ja endokriinse signaalmolekuli funktsioon. SP on näide vähestabiilsest neuropeptiidist, seetõttu ületab tema lokaalne kontsentratsioon harva nanomolaarseid väärtusi. Neuropeptiidid interakteeruvad immuunsüsteemi ja neuroendokriinse süsteemi ning katteepiteelide rakkudega membraanil ekspresseeritud retseptorite kaudu. Tänapäeval on teada palju ning paralleelselt

transkriptoomika meetodite arenguga avastakse juurde järjest uusi neuropeptiide (Secher jt., 2016). Psoriaasi patogeneesi kontekstis on kõige enam uuritud SP, Calcitonin gene related protein (CGRP) ja vasoaktiivset intestinaalset peptiidi. Gastrin releasing protein (GRP) sarnaselt SP-ga on naha sügeluse põhjuseks (Nakamura jt., 2003; Akiyama ja Casters, 2013). Naha sügelemine on subjektiivselt üks raskeimatest, kui mitte kõige raskem, psoriaasi sümptomitest (Szepietowski ja Reich, 2015). Sügelus, segades nii magamist, kui ka aktiivset elu ühelt poolt, ning provotseerides naha katki kratsimist teiselt poolt, raskendab psoriaasi kulgu ning soodustab uute laikude teket (Morhenn, 2018). Kahjuks on sügelust tavaliste meetoditega väga keeruline uurida, kuna sügeluse tunne on küllaltki subjektiivne ning sõltub paljudest teistest faktoritest, näiteks immuunstaatuses, keskkonnast ja indiviidi spetsiifilistest talumatustest (Carstens, 2017). Seetõttu võiks sügeluse molekulaarsete markerite ja nende igakülgse rolli uurimine haiguse kulus olla murranguliselt oluline.

Närvisüsteemi ja immuunsüsteemi interaktsiooni on küllalt palju kirjeldatud SP, GRP ja CGRP vahendatud mastotsüütide degranulatsioonil (Tsugunobu jt., 2011). Vabanenud histamiin, serotoniin, dopamiin, rida proinflammatoorse toimega interleukiine, fosfolipaase proteaase ja kasvufaktoreid põhjustavad põletikku ja sügelust (Wernersson ja Pejler, 2014). Vaskulaarse endoteeli kasvufaktor (ingl *vascular endothelial growth factor* – VEGF) ja kaheksiin stimuleerivad lisaks angiogeneesi, mis on omakorda üks oluline psoriaasi patogeneesi faktor. Siinkohal on oluline mainida, et interakteerudes retseptoritega aferentsetel neuronitel soodustab histamiin neuropeptiidide sekretsiooni ja põletikku (Schmelz jt., 1997). Mastotsüüdid ei ole küll ainukesed rakud, mille aktiivsust neuropeptiidid mõjutavad. Kaltsitoniini retseptor (ingl *calcitonin receptor* – CALCR) on CGRP retseptor, mida ekspresseerivad ka neutrofiilid, monotsüüdid, Langerhansi ning epidermise ja endoteeli rakud (Benemei jt., 2009). Neurokiniini 1 retseptori (NK1R) aktiveerimine SP poolt stimuleerib endoteeli rakkude proliferatsiooni *in vitro* ning soodustab angiogeneesi *in vivo*, mis võib olla oluline psoriaasi patogeneesi kontekstis (Kim jt., 2019). Sarnast toimet omavad ka mõned teised neuropeptiidid, sealhulgas CGRP (Mishima jt., 2010).

Oluliseks teemaks psoriaasi korral on neuropaatilised valud, mida on hakatud põhjalikumalt uurima alles viimasel ajal (Ljosaa jt., 2010). Juba praegu eeldakse, et ka selle sümptomi kujunemises osalevad neuropeptiidid, arvatavasti SP ja CGRP (Pithadia jt., 2018).

Närvisüsteemiga seotud valgud osalevad ka teiste psoriaasi sümptomite tekkes. Neuraalne kasvufaktor (ingl *neural growth factor* – NGF) on neurotrofiinide hulka kuuluv valk, mille peamisteks funktsioonideks on aksonite apoptoosi moduleerimine, nende kasvu, hargnemise ja müeliniseerimise soodustamine. Lisaks sellele on NGF ka neuropeptiidide ekspressiooni positiivne regulaator (Amann jt., 1996). Nii lai efektide spekter on võimalik tänu kahte tüüpi NGF retseptorile (Chen jt., 2009). Tropomüosiini retseptor kinaas A (ingl *tropomyosin receptor kinase A* – TrkA) on kõrge afiinsuse ja spetsiifilisusega, samal ajal on CD271 madala afiinsusega ning võimeline seostuma kõikide neurotrofiinidega, sealhulgas tserebraalse neurotroofse faktori (ingl *Brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), neurotrofiini-3 (NT-3) ja neurotrofiini-4 (NT-4)-ga. Naha homeostaasi kontekstis on neurotrofiinidest kõige paremini uuritud NGF. BDNF ja NT-4 omavad samuti teatud pro-apoptootilist aktiivsust keratinotsüütides, samamoodi CD271 retseptoriga seostumise teel. CD271 ja TrkA on ekspresseeritud lisaks neuronitele ka keratinotsüütides, ning nende õige, diferentseerumise astmest sõltuv koekspressioon on oluline naha homeostaasi toetamisel (Truzzi jt., 2011). NGF peamiseks allikaks nahas on KSC, mis tugevalt ekspresseerib ka TrkA ning väga madalal tasemel CD271. Seetõttu, ekspresseerides neurotrofiine ja nende retseptoreid, on epidermise rakud olulised perifeerse närvisüsteemi innervatsiooni ja arhitektuurimodulaatorid, mille rolli psoriaasis on võimatu eitada (Pincelli, 2017). Kuna CD271 on samuti ekspresseeritud madalamal tasemel veresoontes (Chesa jt., 1988) ja fibroblastides (Barilani jt., 2018), on need seeläbi samuti mõjutatud neurotrofiinide poolt.

Epidermaalne CD271 ekspressioon ei ole ühtlane: CD271 on tugevalt ekspresseeritud epidermise basaalse kihi rakkudes, mida nimetatakse vahepealseteks eellas-keratinotsüütideks. Need on KSC-st enam diferentseerunud, kuid samas aktiivseks proliferatsiooniks valmis järglasrakud. Truzzi jt. (2015) on näidanud, et CD271 on selle pöörduva diferentseerumise protsessi kriitiline regulaator: CD271 ekspressiooni inhibeerimine vastava miRNA-ga vahepealsetes eellastes viis KSC fenotüübi taastumiseni, ning vastupidi viis *in vitro* CD271 hüperekspressioon KSC diferentseerumisele. CD271 on oluline pro-apoptootilise signaali vastuvõtmiseks: CD271 negatiivsemad vahepealsed eellased, mis on rohkelt esindatud psoriaatilise naha epidermises, on apoptoosi resistentsed ning on kriitilise rolliga hüperkeratoosi tekes.

Truzzi jt. (2015) hüpoteesi kohaselt on CD271⁺ vahepealsed eellas-keratinotsüüdid väike rakupopulatsioon, mis kalduvad kiiresti differentseeruma. Rohkem diferentseerunud keratinotsüüdid CD271 ning TrkA ei ekspresseeri.

Sel viisil omab CD271 olulist KSC diferentseerumist stimuleerivat toimet, võttes vastu auto- ja parakriinset NGF signaali. Selle signaalraja düsregulatsiooni korral muutub vahepealsete järglasrakkude proliferatsioon samuti kontrollimatuks, mis viib epidermise struktuuri ja sarvestumise protsessi häiretele. TrkA omab kahesugust toimet: madalama NGF kontsentratsiooni puhul aktiveerib TrkA apoptoosi, kuid suurema NGF kontsentratsiooni korral käivitab sama retseptor proneurogeense reaktsioonide kaskaadi (Truzzi, 2015).

Neuronatiini (Nnat) täpne bioloogiline roll on siiani täpsel määramata. Täheldatud selle lipoproteiini ekspressiooni basaalses epidermaalses kihis ja karvafolliikulis. Nnat reguleerib samuti rakusisest Ca²⁺ kontsentratsiooni high- ja rasunäärmetes ning nende kasvajates (Kanno jt., 2019; Dugu jt., 2010). Psoriaasi puhul on Nnat ebanormaalselt üleekspresseeritud epidermise basaalse ja suprabasaalse kihi rakkudes ning Nnat ekspressioon on seotud diferentseerumisega seotud markeri, involukriini, ekspressiooniga (Dugu jt., 2014). Lisaks olgu mainitud, et patoloogiline Nnat ekspressioon on tuvastatud ka diabeetiliste hiirte aordi endoteelis. Seejuures *in vitro* Nnat ekspressiooni suurendamine inimese aordi endoteeli rakkude (ingl *human aortic endothelial cells* – HAEC) kultuuris aktiveeris NF-κB (ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) transkriptsiooni faktori, mis viis proinflammatoorsete geenide aktivatsioonini. Tuvastati ka adhesioonivalkude, monotsüüdi kemoatraktiive proteiini-1 (ingl *monocyte chemoattractant protein-1* – MCP-1), IL-1 ja IL-6, kaheksiini ekspressiooni aktivatsioon. Teatud proinflammatoorsed reaktsioonid esinesid ka *in vivo* aordis Nnat hüperekspressioonil (Mzhavia jt., 2008). Hiljem sai see tulemus kinnitust (Li jt., 2010) ning Nnat-st sõltuvate proinflammatoorsete geenide nimekiri laienes.

Vaatamata sellele, et algselt seostati Nnat närvisüsteemi arengu regulatsiooniga (Rajiv jt., 1994) ning täiskasvanu närvisüsteemis on selle ekspressioon kasin, võib see olla suurenenud närvisüsteemi traumade, nagu näiteks aksotoomia (Chen jt., 2010) toimel või vähirakkudes (Siu jt., 2008).

1.2.5. Fibroblastide roll psoriaasis

Fibroblastid (FB) on olulised tsütokiinide ja prostaglandiinide tootjad, mis võivad moduleerida immuunsüsteemi, kuid osaleda ka mitmete põletikuliste haiguste ja hüperproliferatiivsete protsesside, arvatavasti ka psoriaasi, patogeneesis (Arasa jt., 2018; Yin jt., 2010). Dermise FB osalevad ka angiogeneesi regulatsioonis. Sarnaselt keratinotsüütidega produtseerivad need VEGF, mis soodustab psoriaasi etioloogia jaoks olulist angiogeneesi. Arvatavasti on VEGF ekspressioon nahas negatiivselt reguleeritud: suurenenud VEGF kontsentratsioon initsieerib angiogeneesi inhibiitori PEDF (ingl *pigment epithelium-derived factor*) produktsiooni nii keratinotsüütides kui ka FBdes (Yan jt., 2018). Vastuseks mõnede proinflammatoorsetele tsütokiinidele toodavad FB NGF'i, mida leidub rikkalikult psoriaasi laigu piirkonnas (Hattori jt., 1994; Sandoval-Talamantes jt., 2020). Madalamates kontsentratsioonides stimuleerib NGF FB aktiivsust, mis tüüpiliselt on vajalik fibroosiks ning koe reparatsiooniks. Seevastu suuremad NGF kontsentratsioonid inhibeerivad kollageeni tootmist, samaaegselt stimuleerides aktiini alfa 2 (ingl *actin alpha 2* – ACTA-2) produktsiooni ehk fibroblastide transformatsiooni müofibroblastideks (Micera jt., 2001; Schafer jt., 2016; Liu jt., 2019).

Lisaks sellele, võib FB aktiivsus olla oluline psoriaasi sümptomite vähendamise faktor. Just põletikulises nahas, kaasa arvatud psoriaasi puhul, produtseerivad FB-d, arvatavasti vastuseks IL-1 ja IL-22 signaalile, membraanseoselist neprilüsiini (ingl *neprilysin*) endopeptidaasi, mis lagundab SP (Xie jt., 2011). SP negatiivseteks regulaatoriteks on ka mastotsüüdid. Nende poolt produtseeritud kumaas lagundab samuti SP-d (Okamura jt., 2017). Sarnasel viisil töötab arvatavasti trüptaas, mis lagundab CGRP (Walls jt., 1992).

Vaatamata mõnede hästi uuritud aspektidele on praeguseks fibroblastide rollist psoriaasis suhteliselt vähe teada, aga juba kogunenud andmete põhjal saab väita, et neil võib olla oluline roll nii psoriaasi kaitsemehhanismides, psoriaasi remisiooni käivitamises kui ka sümptomite ägenemises.

2.EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesolev bakalaureusetöö on osa TÜMRI rakubioloogia õppetoolis Viljar Jaksi töögrupis läbiviidavast uurimustööst, mille käigus uuriti neuronaalsete valkude ekspressiooni kliiniliselt terve ja psoriaasihaige inimese nahas.

Siinse bakalaureusetöö eesmärk on tuvastada:

- kas ja millises piirkonnas on psoriaasi korral toimunud valitud neuronaalsete valkude ja nende retseptorite ekspressiooni muutus
- millistes naha piirkondades toimuvad psoriaasi korral aksonite võrgustiku arhitektuuri muutused ning nende muutuste iseloomustamine

Püstitatud eesmärkide saavutamiseks on kasutatud tervetelt ja psoriaasi põdevatelt inimestelt saadud nahabiopsiaid. Neuronaalsete peptiidide ja nende retseptorite ning teiste naha komponentide, sealhulgas neuronite ja veresoonemarkerite, ekspressiooni ja asukohta on vaadeldud nahabiopsiatest valmistatud lõikudel kasutades immuunfluorestsentsanalüüsi (IFA) meetodit.

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Nahalõikude allikas

Eksperimentides kasutati tervete ja psoriaasi põdevate inimeste nahabiopsiaid. Doonorid allkirjastasid eelnevalt kirjaliku nõusoleku proovi võtmiseks ja kasutamiseks. Biopsiaid kogusid vastava ettevalmistusega nahaarstid prof. Külli Kingo uurimisgrupist ja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliinikust nendele gruppidele väljastatud inimuuringute eetikalubade alusel.

2.2.2. Koelõikude lõikamine

Nahabiopsiatest valmistati krüomikrotoomiga (Leica, DE) 10, 20 ja 25 µm paksused lõigud, mis pandi alusklaasile (StarFrost, Knittel Glass, DE). Klaasidele kinnitatud lõike kuivatati toatemperatuuril umbes 1 tund. Nahalõikudega klaase hoiti kuni eksperimendi alguseni -80°C juures.

2.2.3. Immuonofluorestsentsanalüüsil kasutatud antikehad

Nahakomponentide ja närvikiudude arhitektoonika uurimiseks on kasutatud immuonofluorestsentsanalüüsi meetodit, kus huvipakkuvate valkude visualiseerimiseks inkubeeriti preparaate vastavate monoklonaalsete ja polüklaalsete primaarsete antikehadega. Käesolevas töös kasutatud primaarsete antikehade loetelu on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Immuonofluorestsentsanalüüsis kasutatud naha komponentide vastased primaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Neuronatin (valmistatud küülikus, inimese ja hiire vastane pAb)	1:300	Abcam; ab27266
Substants P (valmistatud rottis, inimese vastane pAb)	1:200	BioSite; 8450-0505
NK1R (valmistatud hiires,	1:200	Thermo Fisher Scientific;

inimese ja hiire vastane pAb)		39-6100
CGRP (valmistatud küülikus, inimese ja hiire vastane pAb)	1:200	Atlas Antibodies; 14959S
CALCR (valmistatud küülikus, inimese vastane pAb)	1:200	Atlas Antibodies; HPA046515
TrkA (valmistatud küülikus, inimese ja hiire vastane pAb)	1:200	Novus Biologicals; NBP2-67473
CD271 (valmistatud küülikus, inimese vastane pAb)	1:200	Sigma Aldrich; HPA004765
TUBB3 (valmistatud küülikus, inimese ja hiire vastane pAb)	1:300	Cell Signaling; 5568S
TUBB3 (valmistatud hiires, inimese ja hiire vastane pAb)	1:300	Abcam; ab78078
PGP9.5 (valmistatud küülikus, inimese ja hiire vastane pAb)	1:200	Millipore; AB1761-I
VWF (valmistatud hiires, inimese vastane pAb)	1:400	BD Pharmingen; 555849
ACTA2 (valmistatud hiires, inimese vastane, mAb)	1:250	Leica microsystems, DE; NCL-SMA
ACTA2 (valmistatud küülikus, inimese vastane pAb)	1:250	Epitomics; 5264-1

Primaarsete antikehadega seostunud märklaudvalkude visualiseerimiseks kasutati fluorokroomiga seotud sekundaarseid antikehi. Käesolevas töös kasutatud sekundaarsed antikehad on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud sekundaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja
Eeslis valmistatud hiire vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A21202
Eeslis valmistatud kitse vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A11055

Eeslis valmistatud rottu vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A21208
Eeslis valmistatud küülilku vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A21206
Eeslis valmistatud hiire vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 594	1:1000	Life technologies, US; A21207
Eeslis valmistatud küülilku vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:1000	Life technologies, US; A-31573
Eeslis valmistatud hiire vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:1000	Life technologies, US; A-31571

Katsetes kasutati kahe terve ja kahe psoriaasi põdeva inimese nahalõike. Iga uuritud komponendi jaoks kasutati kõikidelt patsientidelt vähemalt kahte nahalõiku. Erandiks olid varase psoriaasi arengustaadiumiga patsiendi preparaadid, mis valmistati ühest biopsiast.

2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüs

Immunofluorestsentsanalüüs meetodi esimene etapp on klaasil olevate koelõikude fikseerimine. Parema tulemuse saamiseks kasutati erinevate antikehade jaoks kahte erinevat fikseerimismeetodit: fikseerimine 10 minutit toatemperatuuril 4%-se paraformaldehüüdi (PFA) lahusega (SP, CGRP, NK1R ning CD271 antikehad) või atsetoon-metanool 1:1 seguga -20° C juures (ülejäänud antikehad). Pärast fikseerimist 4% PFA-ga inkubeeriti preparaate 2 minutit fosfaatpuhverdatud soolalahuses (ingl *phosphate buffered saline* – PBS) ning permeabiliseeriti 0,2%-se Triton X-100/PBS-ga. Lõikude hoidmine 15 minutit -20°C juures atsetoon-metanool segus täitis fikseerimise ja permeabiliseerimise eesmärgi. Pärast fikseerimist/permeabiliseerimist pesti preparaate 2 minutit PBS lahusega. Antikehade mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks preparaadi komponentidega inkubeeriti lõike 1-1,5 tundi blokeerimislahuses (5% eesli seerum lahustatud PBS-s). Järgnes lõikude inkubatsioon blokeerimislahuses lahustatud primaarsete antikehadega 4°C juures üleöö. Lõike pesti 3 korda 5 minutit PBS-ga, millele järgnes inkubatsioon blokeerimislahuses lahustatud

sekundaarsete antikehadega toatemperatuuril 1,5 tundi. Pärast 3 korda 5 minutilist pesemist PBS-ga inkubeeriti lõike rakutuumade märgistamiseks 5 minutit DAPI ehk 4',6-diamidino-2-fenüülindooli lahuses (Life technologies). Lõike pesti 5 minutit PBS-ga ja sulundati kasutades Dako fluorestsentssulundusvedelikku (Dako Denmark, DK). Sulundatud lõike säilitati 4°C juures ja pildid värvitud lõikudest tehti kolme päeva jooksul pärast antikehadega värvimist.

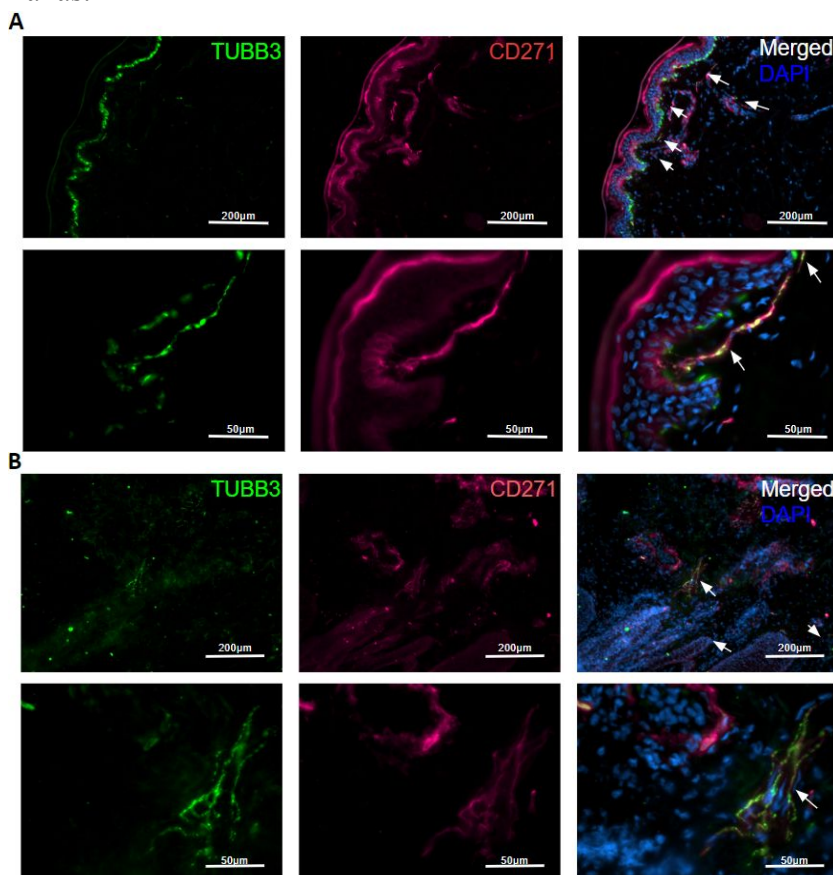
2.2.5. Fluorestsentsmikroskoopia

IFA meetodil värvitud nahalõike vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga Olympus IX81 CellR (Olympus, JP) ja pildid jäädvustati Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics, DE) kaameraga kasutades 10x, 40x või 100x suurendusega objektiive. Mikroskoopia tulemusena saadud pilte töödeldi Hokawo 2.1 pilditöötlusprogrammiga (Hamamatsu Photonics, DE).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. CD271 kui panneuronaalne marker närvikiudude arhitektoonika võrdlemisel

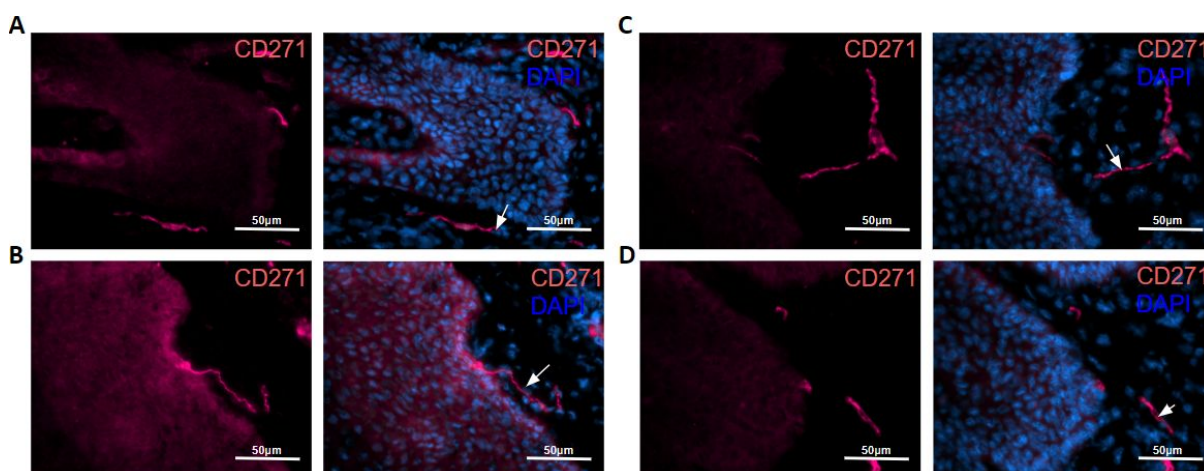
Varasemalt on näidatud, et närvisüsteemist pärit signaalid on ühed kõige olulisemad psoriaasi etioloogia ja patogeneesi faktorid. Vastuseks endo- ja eksogeensetele ärritajatele sekreteerivad piirdenärvisüsteemi neuronid neuropeptide, neurotrofine ja teisi madalmolekulaarseid aineid, mis koos naha mikroobidega mõjutavad kõikide naha komponentide ekspressioonimustrit. See omakorda käivitab lokaalsete ja süsteemsete reaktsioonide kaskaadi, mis võib teatud eelsoodumuste esinemisel põhjustada mitmete dermatooside, sealhulgas ka psoriaasi, teket. Käesolevas töös on võrreldud aksonite võrgustiku ja mõnede neuronaalsete valkude lokaalse ekspressiooni muutusi selleks, et leida uusi seoseid neuronaalsete peptiidide ekspressiooni mustri ja naha ehituslike muutuste vahel kliiniliselt terves ja psoriaasi põdevate inimeste nahas.



Joonis 5. CD271 ja TUBB3 ekspressiooni ja lokaliseerimise võrdlus kliiniliselt terves nahas (A) ja psoriaatilises laigus (B). CD271 märgistab TUBB3 markeriga sarnaseid rakustruktuure ning lisaks sellele annab infot epidermise, veresoonte ja dermise rakkude kohta. Rakutuumad märgistatud DAPIga.

Esialgu kasutati naha närvikiudude märgistamiseks suure spetsiifilisusega neuronite markerit, klass 3 beeta-tubuliini (TUBB3), mis on neuronites paiknevate mikrotorukeste komponent ning rutiinselt kasutatav närvikiudude marker (Latremoliere jt, 2018). Lisaks närvikiududele ekspresseerivad nahas tubuliini beeta 3 (TUBB3) ka melanotsüüdid (Locher jt, 2014). Madala afiinsusega närvikasvu faktori retseptori CD271 ekspressiooni uurimisel selgus, et CD271 ja TUBB3 märgistavad nahas alati täpselt samu närvikiude. Kuna koelõikude värvimine CD271-ga annab aksonite värvimisel TUBB3-ga võrreldes rohkem informatsiooni teiste naha komponentide kohta ning sageli närvikiududest ka parema pildi (joonis 5), siis on edasistes uuringutes närvikoe markerina kasutatud CD271-te (välja arvatud juhud kui antikehade kokkusobimatus seda ei võimaldanud).

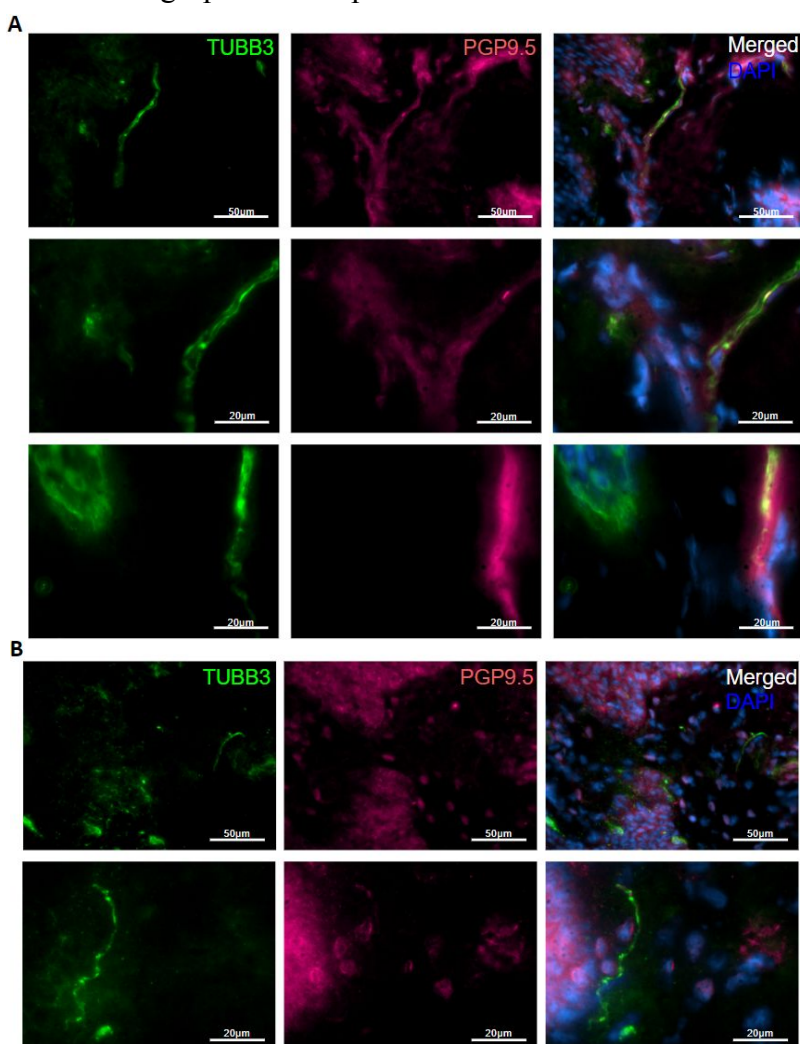
Psoriaatilise laigu arengu varasemates etappides, kus epidermise paksus ning dermaalsete veresoonte tihedus on kroonilise laiguga võrreldes märkimisväärselt väiksem, on närvikiudude tihedus ja struktuuri keerukus võrreldav kontrolliga. Erandiks on kroonilise psoriaasi laik, milles on terve nahaga võrreldes närvikiudude struktuur tugevalt degenerereerunud (joonis 5B). Kroonilise psoriaasi puhul puuduvad peaaegu täiesti keerukamad struktuurid, mis tekivad epidermise rakkude ja peenemate närvikiudude interaktsioonil normaalses nahas (joonis 5A). Psoriaatilise naha dermises on peenemate aksonite tihedus laigus üldiselt madal, tuvastatavad on vaid üksikud aksonid. Sama preparaate epidermises on närvilõpmeid veelgi vähem, neid on võimalik sedastada vaid vähestes preparaatides.



Joonis 6. Närvikiud psoriaatilises nahas tihti ümbritsetud määramata rakkudega (A – C). Seevastu terves nahas taolised „pärlikee” struktuurid on haruldased.

Perifeerne neuropaatia võib tekkida nii kroonilise põletiku, kui ka NGF-CD271 telje düsregulatsiooni tõttu (Cashman ja Höke, 2016). Vähenenud sensoorsete närvikiudude tihedus

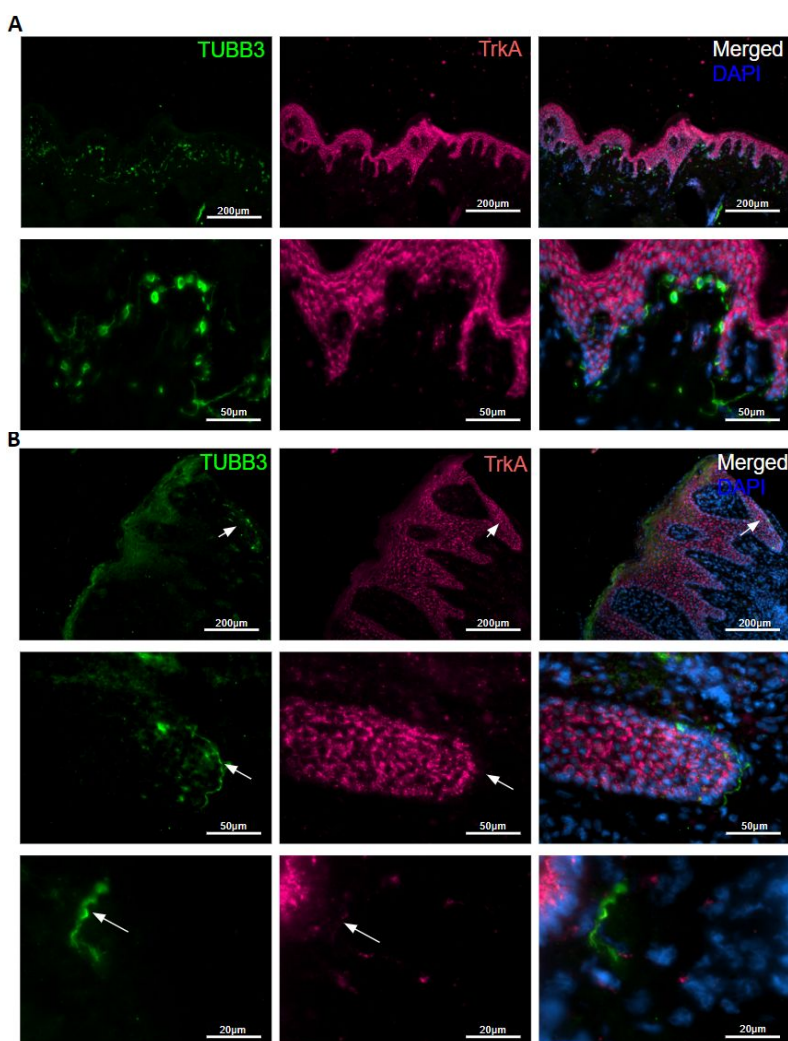
põhjustab omakorda neuropaatiliste valude teket (Oaklander, 2001). Kõikides uuritud psoriaatilistes lõikudes on papillaarse dermise piirkonnas leitavad peenemad närvikiud, mis on rikkalikult ümbritsetud tuvastamata rakkudega (joonis 6). Taolisi struktuure on harva näha terve naha lõikudel, mistõttu võib oletada, et need rakud osalevad psoriaasi patogeneesis, täpsemalt aksoni degeneratsioonis. Aksonopaatia ei ole tüüpiline psoriaatilise naha jaoks, kus tavaliselt tagurpidi närvilõpmete tihedus on võrreldes terve nahaga suurem.



Joonis 7. PGP9.5 ekspressioon terves (A) ja psoriaatilises (B) nahas. Psoriaatilise naha preparaate närvikoos PGP9.5 ekspressioon on madalam võrreldes terve nahaga. Samas, psoriaatilise naha dermises on rikkalikult esindatud PGP9.5 positiivsed rakud, mida ei leidu terves nahas.

Neurodegeneratiivse protsessi tõestamiseks ja NGF rolli hindamiseks võrreldi aksonite kasvu ja apoptoosiga assotsieeritud TrkA retseptori ning aksonogeneesis seotud ubikvintiini hüdroksülaasi PGP9.5 (ingl *protein gene product 9.5*) ekspressiooni kliiniliselt terves ning psoriaatilises nahas. PGP9.5 on tunnustatud standardne marker peenemate närvikiudude visualiseerimiseks ning nende neuropaatia hindamiseks (Acker jt, 2016).

Saadud tulemused kinnitasid TrkA-ga seotud neurodegeneratsiooni hüpoteesi: PGP9.5 valgu ekspressiooni oli vaadeldav terve naha närvikoes (joonis 7A). Oluline on ka see, et PGP9.5 nõrk ekspressioon on tuvastatud terve naha struktuurides, mis sarnanevad veresoontega. Seevastu psoriaatilise naha närvikiududes on PGP9.5 signaal vaid üksikutel juhtudel kõrgema tausta väärtusest (joonis 7B), mis kinnitab selle valgu madalat taset kroonilise psoriaasi närvikoes. Närvikiudude tihedus ning dermo-epidermaalset piiri ületavate aksonite hulk olid psoriaatilises nahas kontrolliga võrreldes oluliselt madalamad.



Joonis 8. TrkA ekspressioon terves (A) ja psoriaatilises (B) nahas.

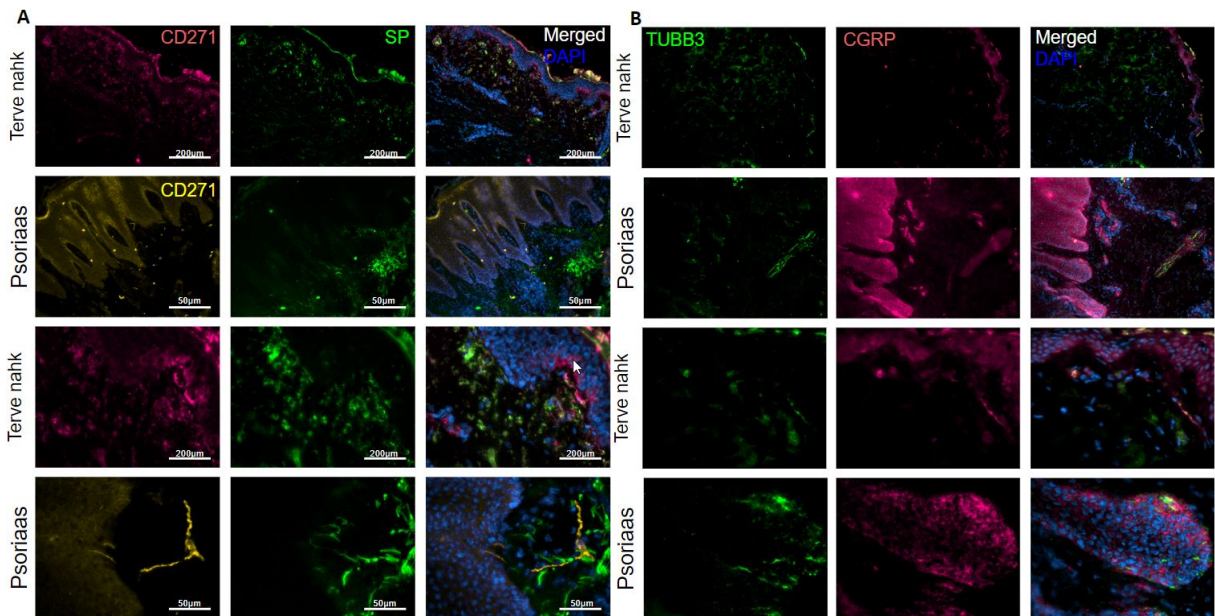
Sarnase tulemuse andis koelõikude värvimine TrkA antikehadega. Võrreldes kontrolliga, kus TrkA positiivseid närvikiude leidub tavaliselt 400x vaatevälja kohta mitu (joonis 8A), on psoriaatilise naha närvikiududes TrkA ekspressioon tuvastatav vaid üksikutes aksonites terve preparaadi kohta (joonis 8B). Lisaks sellele on TrkA positiivsetes aksonites retseptori ekspressioon võrreldes kontrolliga madalam, millest võib järeldada, et NGF retseptori

düsregulatsioon võib olla oluline osa aksonopaatilisest protsessist psoriaasi põdeva inimese nahas.

Kroonilise faasi psoriaasi lõikudel oli PGP9.5 dermaalne ekspressioon leitav ka väljaspool närvikudet (joonis 7B). Tunnustatud närvikoe markerit PGP9.5 ekspresseerisid nahas difuusselt paiknevad rakud ning rakkude kogumid, mis on nende morfoloogiat silmas pidades tõenäoliselt veresooneid ja fibroblastid. Sellist PGP9.5 ekspressiooni difuusselt paiknevates rakkudes ei ole võimalik tuvastada üheski terve naha preparaadis (joonis 7A), samas oli ühel preparaadil võimalik näha mitut positiivset veresoont. Kirjanduses on kirjeldatud PGP9.5 ekspressioon normaalsetes silelihasrakkudes (Campbell jt., 2003) ja ka terve naha haava piirkonnast eraldatud fibroblastides (Olerud jt., 1998). Tähelepanuväärne on ka Kupczyk ja kolleegide töö, kus sarnane PGP9.5 ekspressioon on nähtav psoriaatilise naha preparaatides, kuid sellele ei ole mainitud artiklis tähelepanu pööratud (Kupczyk jt., 2018). Ekstraneuronaalne PGP9.5 ekspressioon on hetkel väga pindmiselt uuritud ning taolist PGP9.5 ekspressioonimustrit pole teadaolevalt psoriaatilises nahas seni kirjeldatud. Seetõttu ei saa ilma lisauuringuteta väita, et PGP9.5 ekspressioon on tõesti iseloomulik fibroblastidele ja silelihasrakkudele. Samuti ei ole kindel, kas selline ekspressioon on põhjustatud psoriaasist ja sellega seotud naha katki kratsimisest, või on need teineteisest sõltumatud nähtused.

2.3.2. Neuropeptiidide ja nende retseptorite ekspressiooni muutused nahas

Neuropeptiidid on ühed peamised signaalmolekulid, mille kaudu närvisüsteem moduleerib neuropeptiidide retseptoreid kandvaid rakke. Lisaks neuronitele reageerivad neuropeptiidide signaalidele ka sellised rakutüübid nagu keratinotsüüdid, APC, fibroblastid, endoteel, leukotsüüdid ja lümfotsüüdid (Mehta ja Granstein, 2019). Neuropeptiidide keeruka signaalvõrgustiku düsregulatsiooni tagajärjel võib tekkida neurogeenne põletik ja psoriaas. SP ja CGRP on psoriaasi ja mõnede teiste dermatooside etiopatogeneesi kontekstis on kõige enam uuritud neuropeptiidid. Laia toimespektri, ekspressioonimustri ning suure individuaalse varieeruvuse tõttu tundus otstarbekas uurida neuropeptiidide ja nende retseptorite, vastavalt NK1R ja CALCR, ekspressiooni terves ja psoriaatilises nahas. SP positiivseid aksoneid õnnestus visualiseerida ainult terve naha lõikudes. Joonisel 9A on näha, et SP on ekspresseeritud terve naha aksonites ja epidermise basaalse kihi rakkudes.

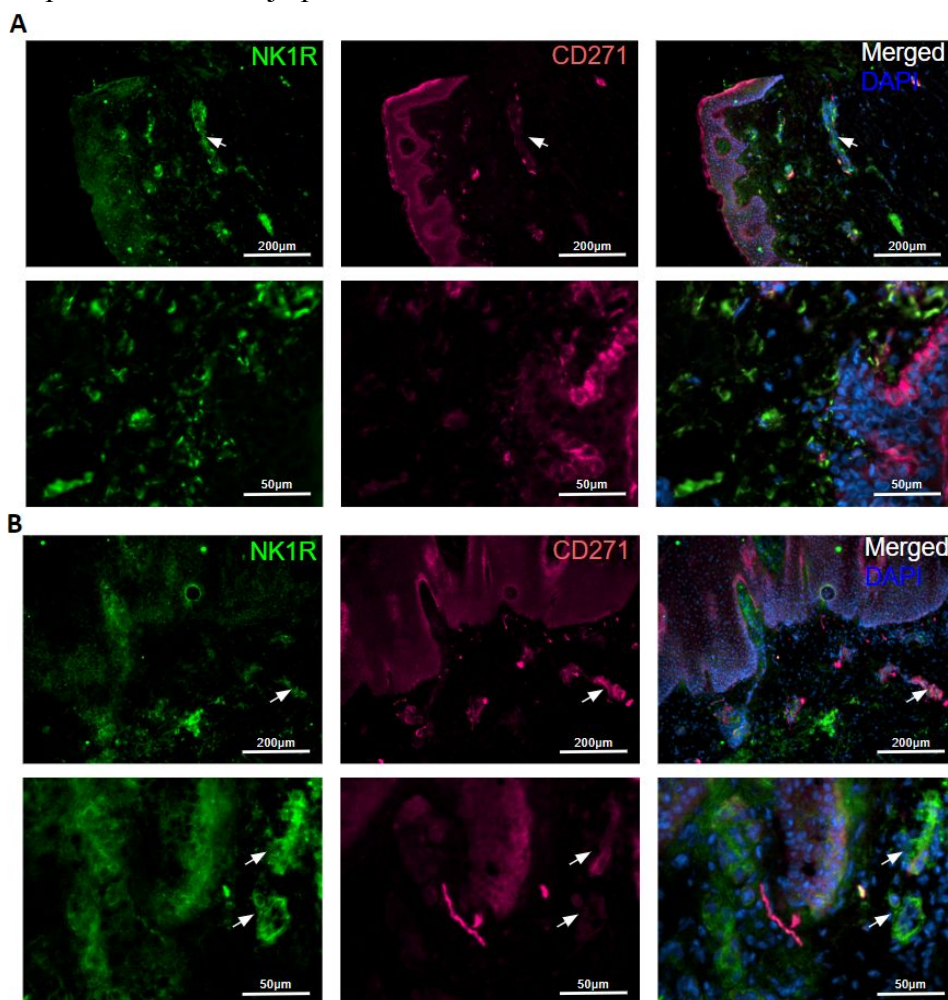


Joonis 9. SP (A) ja CGRP (B) ekspressioon terves ja psoriaatilises nahas. SP ei õnnestunud visualiseerida psoriaatilise naha preparaates kuid terves nahas fikseeritud ka ekstraneuronaalne SP ekspressioon.

SP on samuti tuvastatav veresoontes ja üksikutes dermises paiknevates rakkudes, mis teoreetiliselt võivad olla nii fibroblastid, kui ka immuunrakud. Kuna psoriaatilise naha preparaatide värvimise tingimused olid samad, siis on SP signaali puudumine psoriaatilises nahas võib olla vähemalt osaliselt põhjustatud sensorsete neuronite aksonopaatiaga (joonis 9).

Sama tulemus saadi CGRP visualiseerimisega selle erinevusega, et õnnestus demonstreerida CGRP madalamat ekspressiooni psoriaatilise laigu närvikoes suurema närvkiu näitel (Joonis 9B). Seejuures jääb CGRP ekspressioon närvikoest väljaspool praktiliselt muuutamatuks, mis on SP-ga võrreldes oluline erinevus. Joonisel 9 on näha, et epidermise basaalse kihi rakud ning veresoonte endoteeli rakud annavad kontrolliga võrreldes suhteliselt tugeva signaali. Samal ajal on psoriaatilises nahas peenemate närvikiudude signaal vaevu tugevam taustast. Esiteks kinnitab see varasemalt näidatud tulemust, et epidermis on samuti oluline CGRP allikas, nagu sensorsete neuronite aksonid ning rõhutab veelkord endoteeli väheuuritud, kuid mitmekülgsel rollile psoriaasi etiopatogeneesis (Hou jt., 2011; He jt., 2000). Viimane oluline järeldus, mida saab selle eksperimendi tulemuste põhjal teha on see, et uuritud psoriaasi põdevate indiviidide nahabiopsiates on toimunud sensorsete neuronite neuropaatia, mis on psoriaasi puhul ebatüüpiline, kuid on varasemalt näidatud hiirte nahas indutseeritud kroonilise põletiku korral (Sivilia jt., 2008).

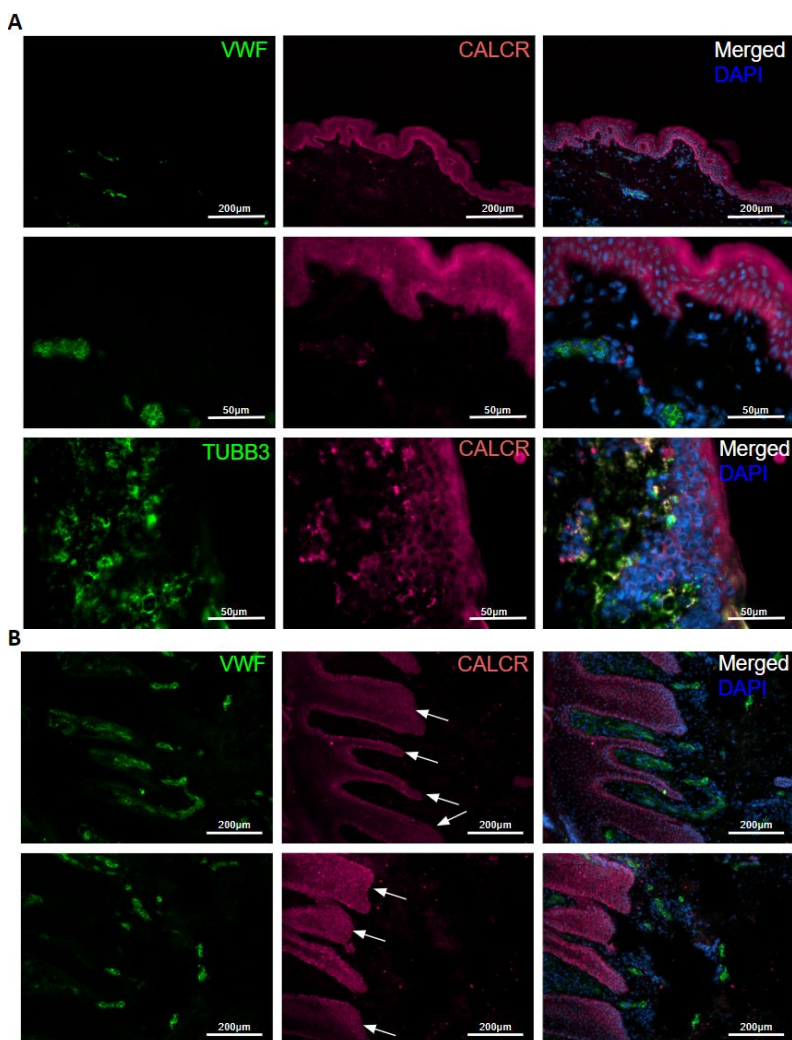
SP ja CGRP toime täpsemaks kirjeldamiseks otsustati visualiseerida vastavate neuropeptiidide retsetoreid NK1R ja CALCR. Katse tulemusena tuvastati erinevused nende retseptorite ekspressioonis terve ja psoriaatilise naha vahel.



Joonis 10. NK1R ekspressioon terves (A) ja psoriaatilises (B) nahas. Nooltega on tähistatud veresooned.

NK1R vahendab pea kõiki psoriaasi patogeneesi kontekstis olulisi SP funktsioone: sügeluse tunde tekitamine, põletiku initsieerimine ja angiogenees. Seetõttu on seda kasutatud SP peamiste märklaudade visualiseerimiseks nahas. Kõige tugevamalt on NK1R ekspresseeritud närvikoes ja epidermises, eriti basaalkihis. Samuti on suhteliselt tugev ja spetsiifiline NK1R ekspressioon tuvastatav veresoontes (joonis 10). Nimetatud naha komponentides on nii kontrolli kui ka psoriaasi puhul NK1R ekspressioonitase suhteliselt muutumatu. Tähelepanuväärne on retseptori tugev ekspressioon papillaarses dermises võrreldes retikulaarse dermise ja epidermisega. NK1R oli ekspresseeritud nii terve kui psoriaatilise naha biopsiate papillaarse dermise rakkudes ning psoriaatilises nahas on NK1R ekspressioon terve nahaga võrreldes tugevam.

Kirjanduse andmete põhjal on selline ekspressioonimuster seletatav NK1R-positiivsete immuunrakkude infiltratsiooni (Zhan jt, 2017; Suvas, 2018), veresoonte hüperplaasia (Lindsey jt., 2000) või suurema NK1R produktsiooniga veresoonte koosseisu kuuluvates rakkudes, mis on tüüpiline dermatoside puhul.



Joonis 11. CALCR ekspressioon terves (A) ja psoriaatilises (B) nahas.

Võrreldes terve nahaga on CALCR positiivseid närvikiude kroonilise psoriaasi preparaatides märkimisväärselt vähem (joonis 11), CALCR positiivsed aksonid kohtuvad vaid üksikutel lõikudel. Seevastu terves nahas leidub neid rohkelt igas lõigus. Käesoleva töö käigus ei olnud võimalik uurida CALCR retseptori ekspressiooni veresoontes, kuna võrreldes epidermise ja närvikiududegaga oli selle ekspressiooni nii nõrk, et signaali oli nii normaalses kui psoriaatilises nahas taustamürast raske eristada.

Tähelepanuväärne on asjaolu, et psoriaatilise naha CALCR epidermaalne ekspressioon basaalse kihi keratinotsüütides on võrreldes kliiniliselt terve nahaga ebaühtlane. Jooniselt 11A on näha, et terve naha epidermise basaalses kihis on CALCR ekspresseeritud märksa tugevamalt, kui epidermise ülemistes kihtides. Samal ajal on kroonilise psoriaasi preparaatidel (joonis 11B) epidermise basaalses ja spinaalses kihis eristatavad kaks keratinotsüütide populatsiooni. Esimene neist on CALCR suhtes positiivsem ja asub reeglina epidermaalsete papillide “servades”, ning teine on papilli tipus paiknev CALCR negatiivsem keratinotsüütide populatsioon.

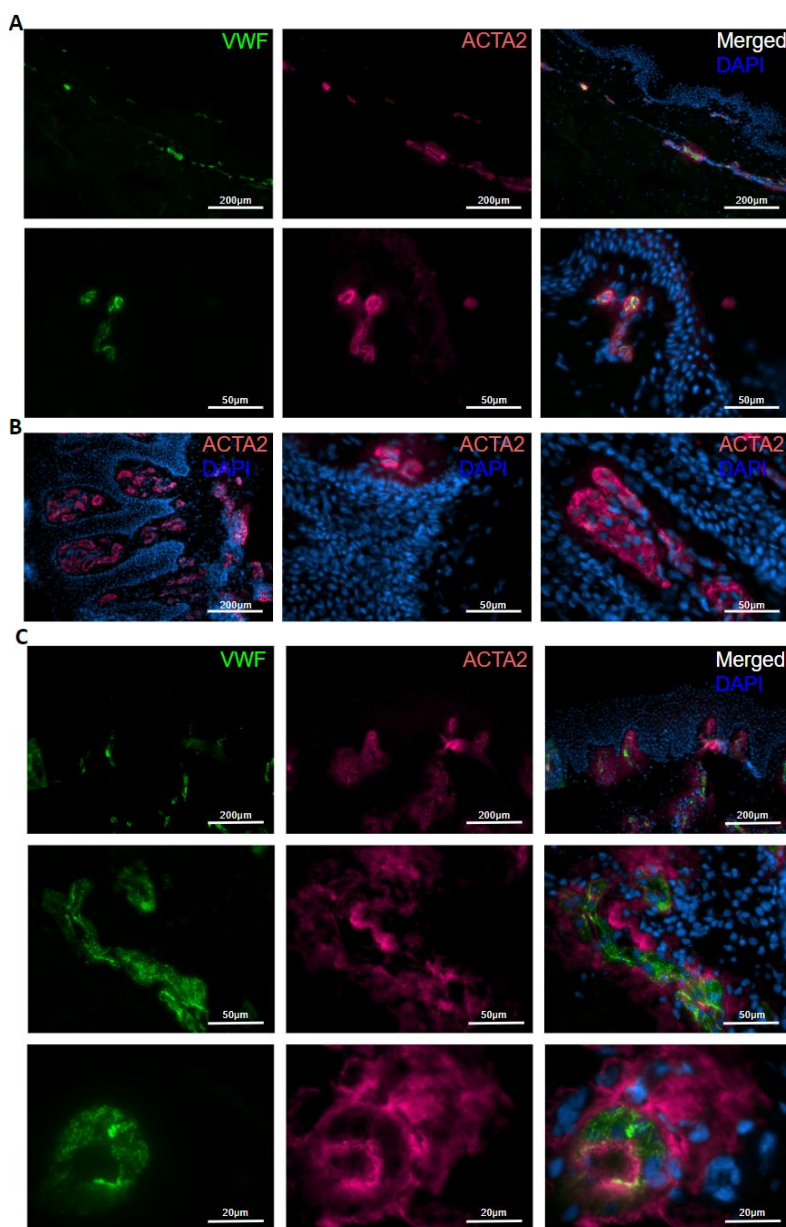
CALCR retseptori laia toimespektri tõttu on antud tulemusest raske teha ühetähenduslikke järeldusi, kuid teades, et CGRP-l on keratinotsüütide proliferatsiooni moduleeriv roll, võib taoline CALCR jaotumine psoriaatilise naha epidermise basaalses kihis peegeldada hüperkeratoosi tekke mehhanismi. Taolist CALCR ekspressioonimustrit on epidermises kirjeldatud sügeluseta psoriaasi korral (Chang jt, 2007), kuid üldiselt on seda nähtust harva mainitud ja kirjeldatud.

2.3.3. Valitud markerite (Nnat, ACTA2, CD271) ekspressiooni võrdlus terve ja psoriaatilise naha epidermises, veresoontes ja dermise rakkudes

Immuunsüsteemi rakkude rolli on psoriaasi etiopatogeneesis ilmselt kõige põhjalikumalt uuritud. Samuti on avaldatud väga palju mitmesuguseid teadustöid epidermise ja närvisüsteemi interaktsioonidest psoriaasi kontekstis. Kuna märksa vähem on praeguseks teada teiste nahas rikkalikult esindatud rakutüüpide seotusest psoriaasiga, on selles töös püütud iseloomustada valitud neuronaalsete valkude ning mõnede teiste selle haiguse kontekstis huvipakkuvate markerite ekspressiooni.

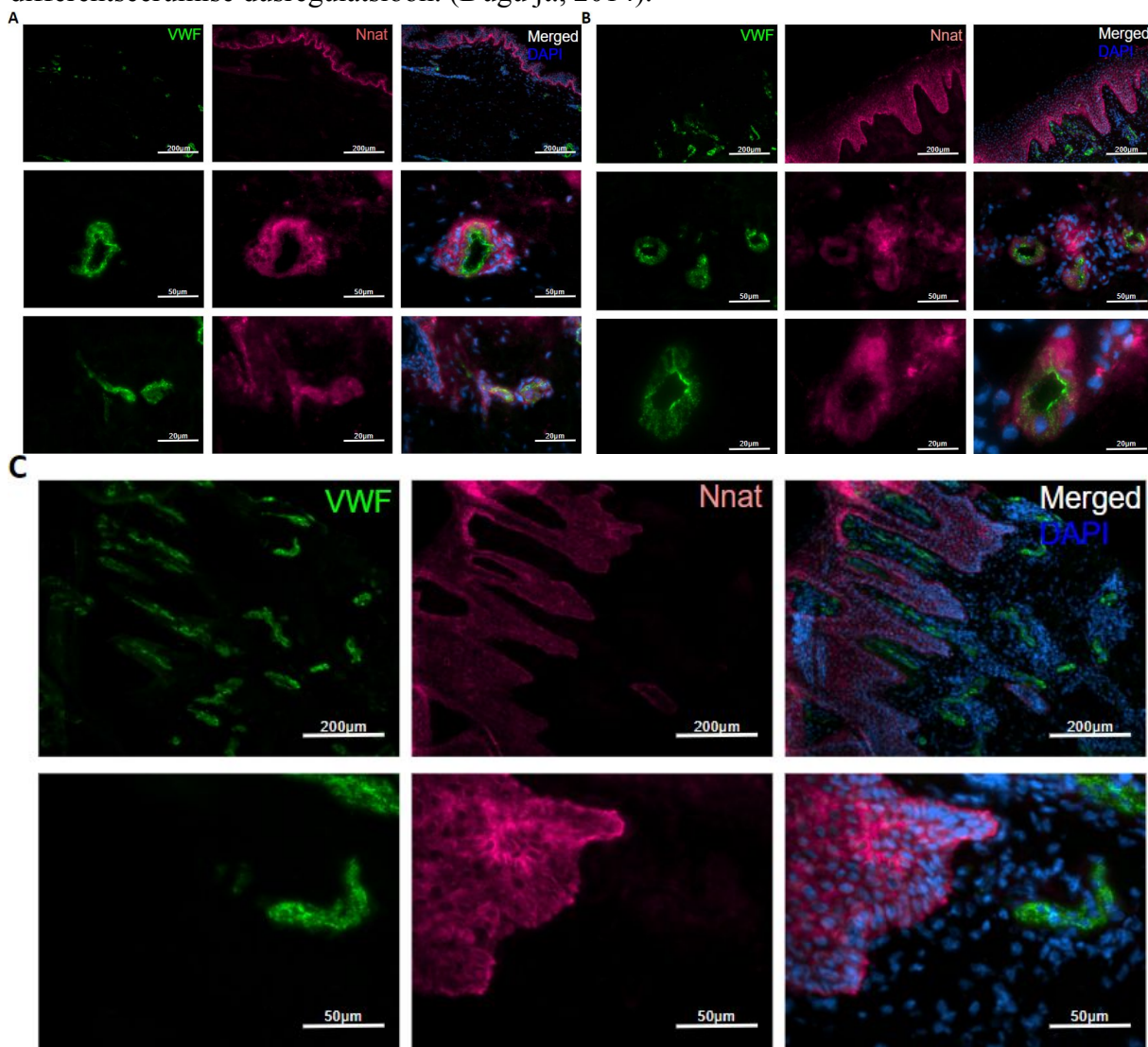
Ühe veresooni märgistava markerina kasutati hemostaasi jaoks olulise rolliga suure spetsiifilisusega endoteeli rakkudes esindatud ja rutiinselt kasutatavat von Willebrandi faktorit (VWF) (Yamamoto jt., 1998). Teiseks veresoonte markeriks, mida terves nahas ekspresseeritakse endoteelis, peritsüütides, higinäärmete müoepiteliaalsetes ja silelihasrakkudes, valiti aktiin-alfa 2 (ACTA2) (Debeer jt., 2013). Kahe erineva veresoonemarkeri samaaegne kasutamine võimaldas kontrollida ACTA2 antikeha spetsiifilisust ning paremini kirjeldada veresoonte struktuuri.

Joonisel 12 on näha psoriaasi jaoks tüüpiline veresoonte hüperplaasia, seda eriti papillaarse ja retikulaarse dermise piirkonnas. Üllatuslikult tuvastati varajase arengustaadiumiga psoriaatilise laigu preparaadis tugev ACTA2 ekspressioon veresooni ümbritsevates rakkudes (joonis 12C). Kuna sellist tulemust pole seni kirjeldatud ei terves ega kroonilise psoriaasi nahas võib oletada, et nendel ACTA2-positiivsetel rakkudel on psoriaasi patogeneesis mingi roll. Täpsemalt tuvastada neid rakke ei õnnestunud.



Joonis 12. ACTA2 ja VWF veresoonte markerite ekspressioon terves nahas (A), kroonilise (B) ja varasema (C) psoriaasi puhul.

Kroonilise psoriaasi lõikudel (joonis 13B, ülemine rida) on Nnat ekspresseeritud kõige tugevamalt epidermise basaalkihi keratinotsüütides ning oluliselt nõrgemalt *stratum spinosum* rakkudes. Kliiniliselt terve naha epidermises on Nnat ekspresseeritud ainult basaalkihi rakkudes (joonis 13A, ülemine rida). Saadud tulemused on kooskõlas kirjanduses ilmunud andmetega, kus uuriti Nnat ja erinevate keratinotsüütide diferentseerumimarkerite koekspressiooni. Sellise Nnat ekspressioonimustri põhjuseks on väidetavalt keratinotsüütide diferentseerumise düsregulatsioon. (Dugu jt., 2014).



Joonis 13. Nnat ekspressioon terves nahas (A), psoriaasi varasemas (B) ja kroonilises (C) staadiumis.

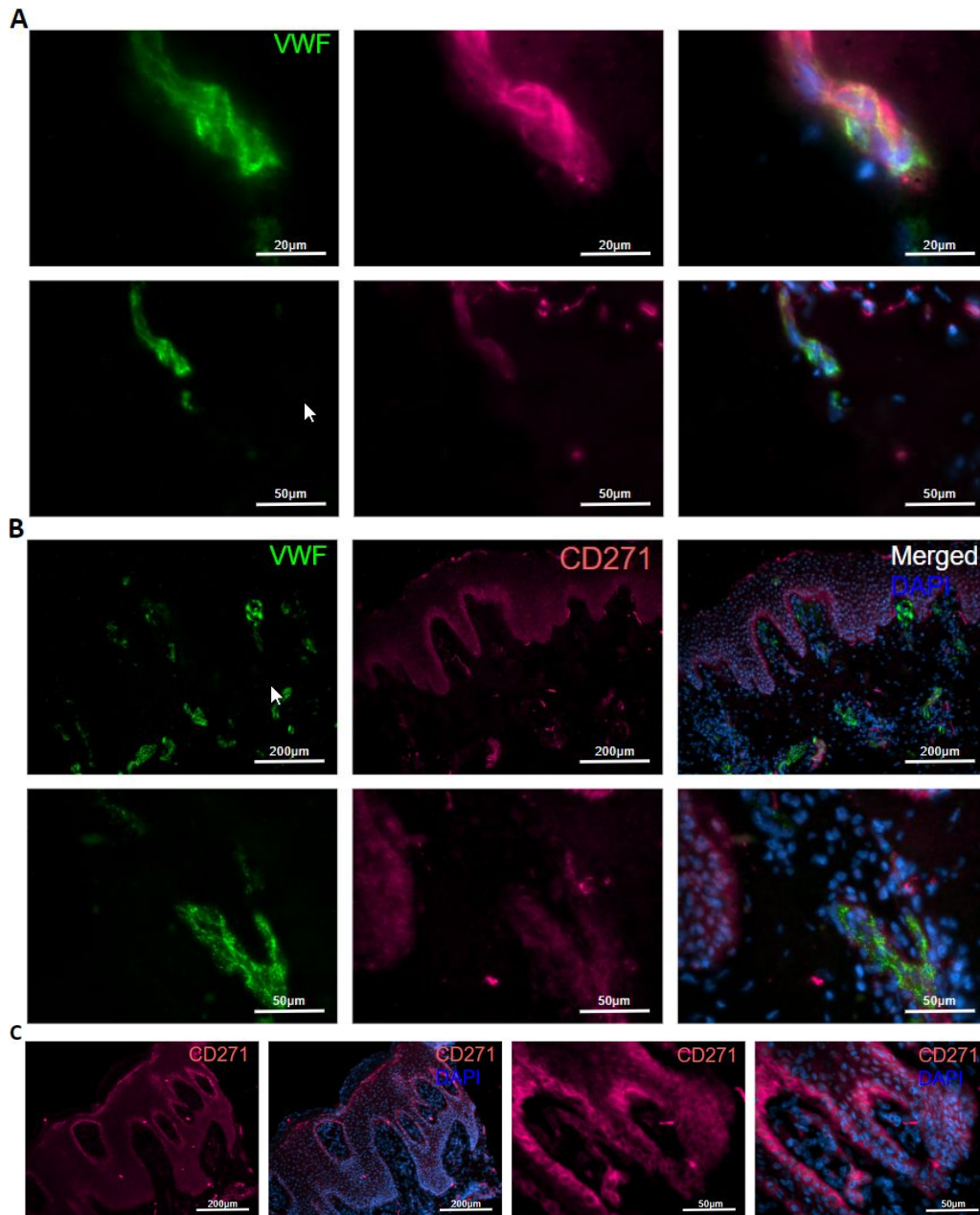
Nagu on juba mainitud (Mzhavia jt., 2008), seostatakse Nnat endoteliaalset ekspressiooni põletikulise protsessiga. Üllatuslikult puudus Nnat ekspressioon psoriaatilise naha endoteelis, mis viitab sellele, et Nnat süntees on haiguse teatud etappidel psoriaatilise naha endoteelis allareguleeritud. Selle tõestamiseks värviti kliiniliselt terve, kroonilise ning varajase psoriaasi

nahalõike samaaegselt VWF ja Nnat vastaste antikehadega. Tulemused (joonis 13) näitasid, et Nnat on võrreldes basaalse epidermise kihiga nõrgemalt, kuid siiski spetsiifiliselt, ekspresseeritud terve ning varajase psoriaasi endoteeli rakkudes, kuid vaid väga madalal tasemel vaadeldav kroonilise psoriaasi lõikudel. Lisaks sellele ekspresseerisid Nnat ka teised veresoonte koosseisu kuuluvad rakud nagu peritsüüdid ja silelihasrakud. Hetkel ei ole teada, kui oluline roll on Nnat-l psoriaasi patogeneesis ning kuidas on seotud psoriaasi sümptomid ning Nnat ekspressiooni allaregulatsioon. Kui arvestada lipoproteiini proinflammatoorsest funktsiooni, siis võib Nnat allaregulatsioon olla adaptiivseks vastuseks kroonilise põletiku tingimustes. Samal ajal on Nnat ekspressioon tõestatud korrelatsioonis funktsionaalselt väga erinevate valkudega. Nende seas on kemokiinid, akvaporin 1, ekstravasatsioonis osalev CD151, transferrini retseptor, VEGF signaali negatiivne regulaator epsiin 2 ja mitmed muud valgud (Li jt, 2010). Seega Nnat rolli täpselt määramiseks psoriaasi kontekstis vaja edasisi uuringuid.

CD271 on epidermises ekspresseeritud ebaühtlaselt. Kliiniliselt terve naha basaalses kihis (joonis 5A) on tuvastatavad CD271 tugevalt positiivne ja negatiivsem keratinotsüütide populatsioon. Teiste epidermise kihtide rakud on nõrgalt CD271 positiivsed. Võrreldes terve nahaga on CD271 ekspressioon psoriaatilises epidermises ühtlasem. Basaalses kihis paiknevad CD271 positiivsemad rakud epidermaalsete papillide servades, kuid CD271 ekspressioon on nendes veidi kõrgem, kui papilli tipu rakkude populatsioonis (joonis 13C). Seejuures varasema staadiumi psoriaasi epidermises (joonis 14B) tundub CD271 ekspressioon tervest nõrgem, kuid psoriaatilisest tugevam. Taoline ekspressioonimuster on põhimõtteliselt kooskõlas juba mainitud (Truzzi jt., 2011; Truzzi jt., 2015) töödega, kuid erinevalt nendest töödest on nõrk CD271 ekspressioon tuvastatav ka psoriaatilise epidermise suprabasaalsetes kihtides. Erinevused võivad olla põhjustatud sellest, et käesolevas töös kasutatud fluorestsentsmikroskoopia tundlikkus on Truzzi ja kolleegide poolt kasutatud valgusmikroskoopiast kõrgem.

Nii kontrollis kui psoriaasis oli regulaarselt vaadeldav tavapärane CD271 ekspressioonimuster, mis tekib närvikiu dermo-epidermaalsel üleminekul (joonis 5A, alumine rida; joonis 6B). Ülemineku piirkonnas paiknevates keratinotsüütides on CD271 ekspressioon alati kõrge ning võrreldatav närvikiuga, mis on naha kõige CD271 positiivsem komponent.

Närvikiud on seejuures tihti, kuid mitte alati, tugevalt hargnenud (joonis 5, alumine rida). Hüpoteetiliselt võiks väita, et kõrge CD271 ekspressioon dermo-epidermaalse ülemineku piirkonna keratinotsüütides on osa aksoni epidermisesse sissekasvumise protsessist (Dechant ja Barde, 2002).



Joonis 14. CD271 ekspressioon terves (A) varasema psoriaasi (B) ja kroonilise psoriaasi (C) staadiumis.

VWF ja CD271 ko-visualiseerimine terves nahas (joonis 14A) näitas, et CD271 on ekspresseeritud ka endoteelirakkudes. CD271 ekspressioon on nähtav ka teistes (joonis 13) veresoonte rakkudes (Dechant ja Barde, 2002). See ekspressioon on oluliselt nõrgem, kui närvikoes, kuid on võrreldav epidermaalse tasemega. CD271 dermaalne ekspressioon

psoriaasi ja terve naha preparaatides on võrreldavad, märkimisväärseid muutusi pole tuvastatud.

KOKKUVÕTE

Psoriaasi laia leviku ning senini täpselt uurimata etiopatogeneesi tõttu on oluline tuvastada kõik potentsiaalselt olulised patoloogilises protsessis osalevad faktorid ja interaktsioonid, mille tulemusena kujunevad välja inimese elukvaliteeti langetavad ja eluohtlikud sümptomid.

Töö eesmärk oli kirjeldada naha närvikoe ehitust ja selle markerite ekspressiooni muutusi psoriaatilises nahas ning võrrelda seda kliiniliselt terve nahaga. Huvipakkuvate markerite visualiseerimiseks kasutati IFA meetodit.

Uurimustöö käigus:

- kirjeldati keratinotsüütide CD271 kõrgeks ekspresseeritud ekspressiooni sõltuvus nende mööda aksonite kasvamisest.
- näidati NGF-assotsieeritud sensoorsete närvide aksonopaatiat psoriaatilises nahas;
- fikseeriti seni kirjeldamata psoriaasi patogeneesiga potentsiaalselt seotud ekstraneuronaalne PGP9.5 ja kontsentiline ACTA2 ekspressioonimuster;
- demonstreeriti CALCR ebatüüpilist ekspressioonimustrit psoriaatilises epidermises;
- näidati esmakordselt Nnat ekspressioon terve naha veresoontes ning Nnat ekspressiooni allaregulatsioon psoriaatilise naha veresoontes.

Kuna töös kasutatud nahabiopsiate kogus oli liiga väike ning katsete läbiviimiseks rakendati ainult immuunfluorestsentsanalüüsi meetodit, siis tuleks edaspidistes uuringutes käesolevas töös püstitatud tulemuste kinnitamiseks suurendada proovide valimit ning rakendada ka teisi lähenemisviise ja meetodeid, kaasa arvatud koekultuuridega eksperimendid.

SUMMARY

The aim of this bachelor's thesis was to compare the expression of neuronal proteins in clinically healthy and psoriatic human skin, to describe and relate the observed differences to changes in skin structure. To achieve these goals, a series of IFA experiments were performed that co-visualized selected neuronal proteins, their receptors, and other widely used markers of skin components in healthy and psoriatic skin.

NGF-associated sensory neuron axonopathy was detected and confirmed in studied psoriatic skin biopsies. This conclusion is based on the results of visualization of the two neural tissue markers CD271 and PGP9.5, dysregulation of the TrkA receptor, which is important for nerve architecture, and downregulation of the highly specific neuropeptides SP and CGRP of sensory axons. To describe more exactly role of used neuropeptides, the expression of NK1R and CALCR receptors in the skin was characterized. The results obtained were in agreement with previously published data, but at the same time it was possible to describe the unusual expression pattern of CALCR, which has so far been described only once in another epidermal morphology psoriasis of an earlier stage of development.

In psoriatic skin, a hitherto undescribed extraneuronal expression pattern of PGP9.5 has been fixed, which may, however, be more common than it first appears.

Visualization of the ACTA2 marker of skin contractile elements in healthy, early, and chronic psoriasis skin supported the hypothesis that its expressing cells are involved in the pathogenesis of psoriasis in its earlier stages. Due to the proven role of hyperplasia of blood vessels in the pathogenesis of psoriasis and the expression of identified neuronal proteins, it has been decided to further investigate the expression of already used markers in blood vessels. This approach was particularly successful with Nnat lipoprotein. For the first time, it has been possible to demonstrate Nnat expression in the blood vessels of the healthy skin, and to prove that not only the endothelium but also other cells in the blood vessels are capable of Nnat expression. For the first time, downregulation of the expression of this protein in blood vessels in the chronic stage of psoriasis has been demonstrated compared to skin in both healthy and earlier stages of psoriasis.

KIRJANDUSE LOETELU

- A.B. Vallbo, H. Olausson, J. Wessberg, N. Kakuda (1995). Receptive field characteristics of tactile units with myelinated afferents in hairy skin of human subjects. *J Physiol.* 483 (Pt 3):783-95.
- Akay, A., Pekcanlar, A., Bozdog, K., Altintas, L., & Karaman, A. (2002). Assessment of depression in subjects with psoriasis vulgaris and lichen planus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 16(4), 347–352.
- Amann, R., Sirinathsinghji, D. J. S., Donnerer, J., Liebmann, I., & Schuligoi, R. (1996). Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: bilateral response to unilateral intraplantar injections. *Neuroscience Letters*, 203(3), 171–174.
- Anthony L. Mescher (2017). *Junqueira's Basic Histology*, 14e, Chapter 18.
- ASAHINA, A., HOSOI, J., GRABBE, S., & GRANSTEIN, R. (1995). Modulation of Langerhans cell function by epidermal nerves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96(6), 1178–1182.
- Barilani, M., Banfi, F., Sironi, S. et al. Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep* 8, 9321 (2018).
- Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J. G., & Geppetti, P. (2009). CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 9–14.
- Bing-Xi Yan, Yu-Xin Zheng, Wei Li, Jia-Qi Chen, Jiong Zhou, Sui-Qing Cai, Min Zheng, Xiao-Yong Man (2018). Comparative Expression of PEDF and VEGF in Human Epidermal Keratinocytes and Dermal Fibroblasts: from Normal Skin to Psoriasis. *Discov Med* 25(136):47-56.
- Boehnke, K., Mirancea, N., Pavesio, A., Fusenig, N. E., Boukamp, P., & Stark, H.-J. (2007). Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *European Journal of Cell Biology*, 86(11-12), 731–746.
- Boffetta, P., Gridley, G., & Lindelöf, B. (2001). Cancer Risk in a Population-Based Cohort of Patients Hospitalized for Psoriasis in Sweden. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(6), 1531–1537.
- Bos, J. D., & De Rie, M. A. (1999). The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunology Today*, 20(1), 40–46.
- Brook, I., Frazier, E. H., & Yeager, J. K. (1999). Microbiology of infected pustular psoriasis lesions. *International Journal of Dermatology*, 38(8), 579–581.

- Campbell, L., Thomas, J., Lamps, L. et al. (2003). Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) Is Not a Specific Marker of Neural and Nerve Sheath Tumors: An Immunohistochemical Study of 95 Mesenchymal Neoplasms. *Mod Pathol* 16, 963–969
- Cashman, C. R., & Höke, A. (2015). Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neuroscience Letters*, 596, 33–50.
- Chan, J., Smoller, B., Raychauduri, S. et al. (1997). Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 289, 611–616.
- Chang, S.-E., Han, S.-S., Jung, H.-J., & Choi, J.-H. (2007). Neuropeptides and their receptors in psoriatic skin in relation to pruritus. *British Journal of Dermatology*, 156(6), 1272–1277.
- Chen, K., Yang, C., Cheng, J. et al. (2010). Altered neuronatin expression in the rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection. *J Biomed Sci* 17, 41.
- Chen, Y., Zeng, J., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., ... Kong, K. (2009). Multiple Roles of the p75 Neurotrophin Receptor in the Nervous System. *Journal of International Medical Research*, 37(2), 281–288.
- Chesa, P. G., Rettig, W. J., Thomson, T. M., Old, L. J., & Melamed, M. R. (1988). Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 36(4), 383–389.
- Cheung, K. L., Jarrett, R., Subramaniam, S., Salimi, M., Gutowska-Owsiak, D., Chen, Y.-L., ... Ogg, G. (2016). Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(11), 2399–2412.
- Choi, J. E., & Di Nardo, A. (2018). Skin neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 40(3), 249–259.
- Choi, Y. M., Debbaneh, M., Weinberg, J. M., Yamauchi, P. S., Van Voorhees, A. S., Armstrong, A. W., ... Wu, J. J. (2016). From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation: Perioperative management of systemic immunomodulatory agents in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(4), 798–805.e7.
- Chularojanamontri, L., Wongpraparut, C., Silpa-Archa, N., Peerapen, P., Boonmark, W., Kulthanan, K., & Thongboonkerd, V. (2018). The humoral immunity to epidermal and dermal antigens in psoriasis: a downstream rather than an upstream event. *Clinical and Experimental Medicine*, 18(3), 453–456.

- Cumberbatch, M., Singh, M., Dearman, R. J., Young, H. S., Kimber, I., & Griffiths, C. E. M. (2006). Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 953–960.
- Cynthia Okoduwa, WC Lambert, RA Schwartz, E Kubeyinje, A Eitokpah, Smeeta Sinha, W Chen (2009). ERYTHRODERMA: REVIEW OF A POTENTIALLY LIFE-THREATENING DERMATOSIS. *IJD*, 54(1): 1–6.
- Damasiewicz-Bodzek, A., & Wielkoszyński, T. (2008). Serologic markers of celiac disease in psoriatic patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(9), 1055–1061.
- Dass, S., Vital, E. M., & Emery, P. (2007). Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis & Rheumatism*, 56(8), 2715–2718.
- De Jesús-Gil, C., Ruiz-Romeu, E., Ferran, M., Chiriac, A., Deza, G., Hóllo, P., ... Santamaria-Babí, L. F. (2018). CLA+ T Cell Response to Microbes in Psoriasis. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Ding, W., Stohl, L. L., Xu, L., Zhou, X. K., Manni, M., Wagner, J. A., & Granstein, R. D. (2016). Calcitonin Gene-Related Peptide-Exposed Endothelial Cells Bias Antigen Presentation to CD4+T Cells toward a Th17 Response. *The Journal of Immunology*, 196(5), 2181–2194.
- Dugu, L., Nakahara, T., Wu, Z., Uchi, H., Liu, M., Hirano, K., ... Furue, M. (2014). Neuronatin is related to keratinocyte differentiation by up-regulating involucrin. *Journal of Dermatological Science*, 73(3), 225–231.
- DUGU, L., TAKAHARA, M., TSUJI, G., IWASHITA, Y., LIU, X., & FURUE, M. (2010). Abundant expression of neuronatin in normal eccrine, apocrine and sebaceous glands and their neoplasms. *The Journal of Dermatology*, 37(9), 846–848.
- El-Ghalbzouri, A., Gibbs, S., Lamme, E., Van Blitterswijk, C. A., & Ponc, M. (2002). Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *British Journal of Dermatology*, 147(2), 230–243.
- Esposito, M., Saraceno, R., Giunta, A., Maccarone, M., & Chimenti, S. (2006). An Italian Study on Psoriasis and Depression. *Dermatology*, 212(2), 123–127.
- Eyden, B. (2007). Translational Medicine: The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 22–37.
- Farber, E. M., Nickoloff, B. J., Recht, B., & Fraki, J. E. (1986). Stress, symmetry, and psoriasis: Possible role of neuropeptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 14(2), 305–311.
- Farber EM, Nall L (1998). Epidemiology: natural history and genetics. In: Roenigk HH Jr,
- Fry L, Baker BS (2007). Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol*; 25:606–15.

- Fuchs, E. (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J. Cell Biol.* 180, 273-284.
- Fuentes-Duculan, J., Bonifacio, K. M., Hawkes, J. E., Kunjraiva, N., Cueto, I., Li, X., ... Krueger, J. G. (2017). Autoantigens ADAMTSL5 and LL37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Experimental Dermatology*, 26(11), 1075–1082.
- Galluzzo, M., Talamonti, M., Di Stefani, A., & Chimenti, S. (2015). Linear psoriasis following the typical distribution of the sciatic nerve. *Journal of Dermatological Case Reports*, 9(1).
- Garritsen, F. M., Kraag, D. E., & de Graaf, M. (2017). Guttate psoriasis triggered by perianal streptococcal infection. *Clinical and Experimental Dermatology*, 42(5), 536–538.
- Geel, MJ van, Oostveen, AM, Hoppenreijts, EPH, Hendriks, JCM, Kerkhof, PCM van de, de Jong, EMGJ, & Seyger, MMB (2015). Метотрексат при псориазе по типу бляшек у детей. Долгосрочная ежедневная клиническая практика является результатом регистрации Child-CAPTURE. *Журнал дерматологического лечения*, 26 (5), 406–412.
- Gladman, D. D. (2005). Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(suppl_2), ii14–ii17.
- Gliński, W., Jabłońska, S., Imiela, J., Nosarzewski, J., Jarzabek-Chorzelska, M., Haftek, M., & Obalek, S. (1979). Continuous peritoneal dialysis for treatment of psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 265(3), 337–341.
- Golara Honari, Howard Maibach (2014). Skin Structure and Function. *Applied Dermatotoxicology*, Chapter 1, pp.1-10.
- Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti, S., Krueger, G. G. Fry, L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology*, 156(2), 258–262.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J.-M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636), 861–861.
- Hasegawa, T. (2003). Expression of smooth muscle markers in so called malignant fibrous histiocytomas. *Journal of Clinical Pathology*, 56(9), 666–671.
- Hattori, A., Iwasaki, S., Murase, K., Tsujimoto, M., Sato, M., Hayashi, K., & Kohno, M. (1994). Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon- γ in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Letters*, 340(3), 177–180.

Heidenreich, R., Röcken, M., & Ghoreschi, K. (2009). Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 232–248.

He Y, Ding G, Wang X, Zhu T, Fan S. Calcitonin gene-related peptide in Langerhans cells in psoriatic plaque lesions. *Chinese Medical Journal*. 2000 Aug;113(8):747-751.

Hönigsmann, H. (2002). Phototherapy for psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(4), 343–350.

Hosoi, J., Murphy, G. F., Egan, C. L., Lerner, E. A., Grabbe, S., Asahina, A., & Granstein, R. D. (1993). Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 363(6425), 159–163.

Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Albrecht, P. (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β : Implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *Pain*, 152(9), 2036–2051.

Hübner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fässler, R., & Werner, S. (1996). DIFFERENTIAL REGULATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING WOUND HEALING IN NORMAL AND GLUCOCORTICOID-TREATED MICE. *Cytokine*, 8(7), 548–556.

Humbert, P., Bidet, A., Treffel, P., Drobacheff, C., & Agache, P. (1991). Intestinal permeability in patients with psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 2(4), 324–326.

Jennifer Y. Lin, David E. Fisher (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445, 843–850

Jonathan Halevy, MD; Sima Halevy, MD; Eleasar J. Feuerman, MD (1979). Dialysis for Psoriasis. *JAMA*. 1979;241(20):2144.

Jorge Arasa¹, María Carmen Terencio¹, Rosa M. Andrés, Asunción Marín-Castejón, Arasa J, Terencio M, Andrés RM, Marín-castejón A, Vlacuende-cavero F, Payá M and Montesinos M (2018). Defective induction of COX-2 expression by psoriatic fibroblasts promotes pro-inflammatory activation of macrophages. *Front. Immunol.* 10:536.

Joseph T, Kurian J, Warwick DJ, Friedmann PS (2005). Unilateral remission of psoriasis following traumatic nerve palsy. *British Journal of Dermatology*, 152(1), 185–186.

Kanno, N., Yoshida, S., Kato, T., & Kato, Y. (2019). Characteristic Localization of Neuronatin in Rat Testis, Hair Follicle, Tongue, and Pancreas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 002215541983643.

Karen, S.-T. A., Gómez-González, B. A., Uriarte-Mayorga, D. F., Martínez-Guzman, M. A., Alejandra, W.-H. K., & Anabell, A.-N. (2019). Neurotransmitters, neuropeptides and their receptors interact with immune response in healthy and psoriatic skin. *Neuropeptides*, 102004.

- Kaushik, S. B., & Lebwohl, M. G. (2018). CME Part II Psoriasis: Which Therapy for Which Patient Focus on special populations and chronic infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Kim, S., Piao, J., Hwang, D. Y., Park, J. S., Son, Y., & Hong, H. S. (2019). Substance P accelerates wound repair by promoting neovascularization and preventing inflammation in an ischemia mouse model. *Life Sciences*, 225, 98–106.
- Kupczyk, P., Reich, A., Gajda, M., Hołysz, M., Wysokińska, E., Paprocka, M., ... Szepietowski, J. C. (2018). UCHL1/PGP 9.5 Dynamic in Neuro-Immune-Cutaneous Milieu: Focusing on Axonal Nerve Terminals and Epidermal Keratinocytes in Psoriatic Itch. *BioMed Research International*, 2018, 1–13.
- Lande, R., Botti, E., Jandus, C., Dojcinovic, D., Fanelli, G., Conrad, C., ... Frasca, L. (2014). The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature Communications*, 5(1).
- Latremoliere, A., Cheng, L., DeLisle, M., Wu, C., Chew, S., Hutchinson, E. B., ... Engle, E. C. (2018). Neuronal-Specific TUBB3 Is Not Required for Normal Neuronal Function but Is Essential for Timely Axon Regeneration. *Cell Reports*, 24(7), 1865–1879.e9.
- Levine, D., & Gottlieb, A. (2009). Evaluation and Management of Psoriasis: An Internist's Guide. *Medical Clinics of North America*, 93(6), 1291–1303.
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18.
- Li, X., Thomason, P.A., Withers, D.J. et al. (2010). Bio-informatics analysis of a gene co-expression module in adipose tissue containing the diet-responsive gene Nnat. *BMC Syst Biol* 4, 175.
- Liao, P. B., Rubinson, R., Howard, R., Sanchez, G., & Frieden, I. J. (2002). Annular Pustular Psoriasis-Most Common Form of Pustular Psoriasis in Children: Report of Three Cases and Review of the Literature. *Pediatric Dermatology*, 19(1), 19–25.
- Lindsey, K. Q., Caughman, S. W., Olerud, J. E., Bunnett, N. W., Armstrong, C. A., & Ansel, J. C. (2000). Neural Regulation of Endothelial Cell-Mediated Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 74–78.
- Liu, J.-Y., Hu, J.-H., Zhu, Q.-G., Li, F.-Q., & Sun, H.-J. (2006). Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts. *British Journal of Dermatology*, 155(4), 657–662.
- Liu, Z., Cao, Y., Liu, G., Yin, S., Ma, J., Liu, J., ... Wang, Y. (2019). p75 neurotrophin receptor regulates NGF-induced myofibroblast differentiation and collagen synthesis through MRTF-A. *Experimental Cell Research*, 111504.

- Ljosaa, T., Rustoen, T., Mørk, C., Stubhaug, A., Miaskowski, C., Paul, S., & Wahl, A. (2010). Skin Pain and Discomfort in Psoriasis: An Exploratory Study of Symptom Prevalence and Characteristics. *Acta Dermato Venereologica*, 90(1), 39–45.
- Locher, H., Frijns, J. H. M., Huisman, M. A., & De Sousa Lopes, S. M. C. (2014). TUBB3: Neuronal Marker or Melanocyte Mimic? *Cell Transplantation*, 23(11), 1471–1473.
- Lotti, T., Bianchi, B., & Panconesi, E. (1999). Neuropeptides and skin disorders. The new frontiers of neuro-endocrine-cutaneous immunology. *International Journal of Dermatology*, 38(9), 673–675.
- Luis J. Borda and Tongyu C. Wikramanayake (2015). Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Investigative Dermatology*, 3(2).
- M.P. Welch, G.F. Odland, R.A. Clark (1990). Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*, 110, pp. 133-145
- Maibach HI, editors. Psoriasis. New York: Dekker. p. 107–57.
- Mallbris, L., Granath, F., Hamsten, A., & Ståhle, M. (2006). Psoriasis is associated with lipid abnormalities at the onset of skin disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(4), 614–621.
- Maza, A., Montaudié, H., Sbidian, E., Gallini, A., Aractingi, S., Aubin, F., ... Paul, C. (2011). Oral cyclosporin in psoriasis: a systematic review on treatment modalities, risk of kidney toxicity and evidence for use in non-plaque psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 19–27.
- Mc EvoyJ, Kelly AMT (1976). Psoriatic clearance during hemodialysis. *Ulster Med T*1976; 45:76-78.
- McGonagle, D. (2009). Enthesitis: an autoinflammatory lesion linking nail and joint involvement in psoriatic disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23, 9–13.
- McMillin BD, Maddern BR, Graham WR (1999). A role for tonsillectomy in the treatment of psoriasis? *Ear Nose Throat J*. 1999 Mar;78(3):155-8.
- Mehta, D., & Granstein, R. D. (2019). Immunoregulatory Effects of Neuropeptides on Endothelial Cells: Relevance to Dermatological Disorders. *Dermatology*, 1–12.
- Menter A, Gottlieb A, et al. “Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis, Section 1: Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics.” *J Am Acad Dermatol*. 2008; 58:826-50

- Micera, A., Vigneti, E., Pickholtz, D., Reich, R., Pappo, O., Bonini, S., ... Levi-Schaffer, F. (2001). Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6162–6167.
- Michaëlsson, G., Gerdén, B., Hagforsen, E., Nilsson, B., Pihl-Lundin, I., Kraaz, W., ... Löf, L. (2000). Psoriasis patients with antibodies to gliadin can be improved by a gluten-free diet. *British Journal of Dermatology*, 142(1), 44–51.
- Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.-L., ... Feuilleley, M. G. J. (2013). Effects of a Skin Neuropeptide (Substance P) on Cutaneous Microflora. *PLoS ONE*, 8(11), e78773.
- Miller, I. M., Ellervik, C., Yazdanyar, S., & Jemec, G. B. E. (2013). Meta-analysis of psoriasis, cardiovascular disease, and associated risk factors. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(6), 1014–1024.
- Mishima, T., Ito, Y., Hosono, K., Tamura, Y., Uchida, Y., Hirata, M., ... Majima, M. (2011). Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(2), H431–H439.
- Moll, J. M. H., & Wright, V. (1973). Psoriatic arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 3(1), 55–78.
- Morar, N., Willis-Owen, S. A., Maurer, T., & Bunker, C. B. (2010). HIV-associated psoriasis: pathogenesis, clinical features, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(7), 470–478.
- Morhenn, V. B. (2018). The Relationship of Wound Healing with Psoriasis and Multiple Sclerosis. *Advances in Wound Care*, 7(6), 185–188.
- Murphy, G., & Reich, K. (2011). In touch with psoriasis: topical treatments and current guidelines. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 3–8.
- Mzhavia, N., Yu, S., Ikeda, S., Chu, T. T., Goldberg, I., & Dansky, H. M. (2008). Neuronatin: A New Inflammation Gene Expressed on the Aortic Endothelium of Diabetic Mice. *Diabetes*, 57(10), 2774–2783.
- Najarian, D. J., & Gottlieb, A. B. (2003). Connections between psoriasis and Crohn's disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(6), 805–824.
- Naukkarinen, A., Nickoloff, B. J., & Farber, E. M. (1989). Quantification of Cutaneous Sensory Nerves and Their Substance P Content in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 92(1), 126–129.
- N'Diaye, A., Gannesen, A., Borrel, V., Maillot, O., Enaut, J., Racine, P.-J., Feuilleley, M. G. J. (2017). Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide: Key Regulators of Cutaneous Microbiota Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 8.

- Oaklander, A. L. (2001). The density of remaining nerve endings in human skin with and without postherpetic neuralgia after shingles. *Pain*, 92(1), 139–145.
- Okamura, Y., Mishima, S., Kashiwakura, J., Sasaki-Sakamoto, T., Toyoshima, S., Kuroda, K., Okayama, Y. (2017). The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergology International*, 66, S9–S20.
- Olerud, J. E., Chiu, D. S., Usui, M. L., Gibran, N. S., & Ansel, J. C. (1998). Protein Gene Product 9.5 is Expressed by Fibroblasts in Human Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(4), 565–572.
- Osaka, N., Takahashi, T., Murakami, S., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Fujiwara, T., Aburatani, H., Moriyama, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007). ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. *J. Cell Biol.* 176, 903-909.
- Pacan P. Szepietowski J.C. Kiejna A. (2003). Stressful Life Events and Depression in Patients Suffering from Psoriasis Vulgaris, *Dermatol Psychosom* 2003;4:142–145.
- Parrish, J. A., & Jaenicke, K. F. (1981). Action Spectrum for Phototherapy of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 76(5), 359–362.
- Payne, R. W. (1967). Severe outbreak of surgical sepsis due to *Staphylococcus aureus* of unusual type and origin. *BMJ*, 4(5570), 17–20.
- Pincelli, C. (2017). p75 Neurotrophin Receptor in the Skin: Beyond Its Neurotrophic Function. *Frontiers in Medicine*, 4.
- Pithadia, D., Reynolds, K., Lee, E., & Wu, J. (2018). Psoriasis-Associated Cutaneous Pain: Etiology, Assessment, Impact, and Management. *Journal of Dermatological Treatment*, 1–21.
- Pratsinis, A., Devuyst, O., & Leroux, J.-C. (2018). Peritoneal dialysis beyond kidney failure? *Journal of Controlled Release*, 282, 3–12.
- Qiu, J., Yuan, Y., Li, Y., Haley, C., Mui, U. N., Swali, R., ... Wu, T. (2019). Discovery of IgG4 Anti - Gliadin Autoantibody as a Potential Biomarker of Psoriasis Using an Autoantigen Array. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 1800114.
- Rajiv Joseph, Dexian Dou and Wayne Tsang (1994) Molecular cloning of a novel mRNA (Neuronatin) that is highly eüpressed in neonatal mammalian brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, (3), 1227—1234.
- Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E., & Raychaudhuri, S. P. (2014). Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 490–495.

- Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E., & Raychaudhuri, S. P. (2014). Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 490–495.
- Raychaudhuri, S. P., Jiang, W.-Y., Raychaudhuri, S. K., & Krensky, A. M. (2004). Lesional T cells and dermal dendrocytes in psoriasis plaque express increased levels of granulysin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(6), 1006–1008.
- Reznik M. [Structure and functions of the cutaneous nervous system] *Pathologie-biologie*. 1996 Dec;44(10):831-837.
- Sabine DEBEER, Jean-Benoît LE LUDUEC, Dominique KAISERLIAN, Philippe LAURENT, Jean-Francois NICOLAS, Bertrand DUBOIS, Jean KANITAKIS (2013). Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol*; 23(4): 456-66
- Sagi, L., & Trau, H. (2011). The Koebner phenomenon. *Clinics in Dermatology*, 29(2), 231–236.
- Scara, R., Oriente, P., Pucino, A., Torella, M., Vignone, L., Riccio, A., & Oriente, C. B. (1984). PSORIATIC ARTHRITIS IN PSORIATIC PATIENTS. *Rheumatology*, 23(4)
- Schafer, P. H., Truzzi, F., Parton, A., Wu, L., Kosek, J., Zhang, L.-H., ... Pincelli, C. (2016). Phosphodiesterase 4 in inflammatory diseases: Effects of apremilast in psoriatic blood and in dermal myofibroblasts through the PDE4/CD271 complex. *Cellular Signalling*, 28(7), 753–763.
- Schmelz, M., Luz, O., Averbeck, B., & Bickel, A. (1997). Plasma extravasation and neuropeptide release in human skin as measured by intradermal microdialysis. *Neuroscience Letters*, 230(2), 117–120.
- Secher, A., Kelstrup, C. D., Conde-Frieboes, K. W., Pyke, C., Raun, K., Wulff, B. S., & Olsen, J. V. (2016). Analytic framework for peptidomics applied to large-scale neuropeptide identification. *Nature Communications*, 7, 11436.
- Singh, G., & Rao, D. J. (1978). Bacteriology of Psoriatic Plaques. *Dermatology*, 157(1), 21–27.
- Siu, I.-M., Bai, R., Gallia, G. L., Edwards, J. B., Tyler, B. M., Eberhart, C. G., & Riggins, G. J. (2008). Coexpression of neuronatin splice forms promotes medulloblastoma growth. *Neuro-Oncology*, 10(5), 716–724.
- Sivilia, S., Paradisi, M., D’Intino, G., Fernandez, M., Pirondi, S., Lorenzini, L., Calzà, L. (2008). Skin homeostasis during inflammation, a role for nerve growth factor. *Histol Histopathol* 23: 1-10
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., & Tobin, G. R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery*, 176(2), 26S–38S.

- Stawczyk-Macieja, M., Szczerkowska-Dobosz, A., Rębała, K., Gabig-Cimińska, M., Nowicki, R. J., Haraś, A., ... Kapińska, E. (2018). ERAP1 and HLA-C*06 are strongly associated with the risk of psoriasis in the population of northern Poland. *Advances in Dermatology and Allergology*, 35(3), 286–292.
- Strassner, J. P., Rashighi, M., & Harris, J. E. (2016). Melanocytes in psoriasis: convicted culprit or bullied bystander? *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(3), 261–263.
- Suvas, S. (2017). Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *The Journal of Immunology*, 199(5), 1543–1552.
- Thomas, J., Küpper, M., Batra, R., Jargosch, M., Atenhan, A., Baghin, V., ... Garzorz-Stark, N. (2018). Is the humoral immunity dispensable for the pathogenesis of psoriasis? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
- Thomas M. Brown; Karthik Krishnamurthy (2018). *Histology, Dermis*.
- Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Sigurgeirsson, B., Olafsson, J. H., Petersen, H., Sigurdsson, M. I., Valdimarsson, H. (2016). HLA-Cw6 homozygosity in plaque psoriasis is associated with streptococcal throat infections and pronounced improvement after tonsillectomy: A prospective case series. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(5), 889–896.
- Todberg, T., Zachariae, C., Bregnhøj, A., Hedelund, L., Bonefeld, K. K., Nielsen, K., ... Skov, L. (2017). The effect of botulinum neurotoxin A in patients with plaque psoriasis - an exploratory trial. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32(2), e81–e82.
- Treede, R. Neurophysiological studies of pain pathways in peripheral and central nervous system disorders. *J Neurol* 250, 1152–1161 (2003).
- Truzzi, F., Marconi, A., Atzei, P. et al. (2011). p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ* 18, 948–958.
- Truzzi, F., Saltari, A., Palazzo, E., Lotti, R., Petrachi, T., Dallaglio, K., ... Marconi, A. (2015). CD271 Mediates Stem Cells to Early Progeny Transition in Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3), 786–795.
- Van Acker, N., Ragé, M., Sluydts, E., Knaapen, M. W. M., De Bie, M., Timmers, M., ... Cras, P. (2016). Automated PGP9.5 immunofluorescence staining: a valuable tool in the assessment of small fiber neuropathy? *BMC Research Notes*, 9(1).

- Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., ... Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836–5845.
- Varjonen, E., Vainio, E., & Kalimo, K. (2000). Antigliadin IgE - indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy*, 55(4), 386–391.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542.
- Vered Levy, Catherine Lindon, Ying Zheng, Brian D. Harfe, and Bruce A. Morgan (2007). Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *Faseb Vol. 21*, No. 7
- Walls, A. F., Brain, S. D., Desai, A., Jose, P. J., Hawkings, E., Church, M. K., & Williams, T. J. (1992). Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin generelated peptide. *Biochemical Pharmacology*, 43(6), 1243–1248.
- Wang, C.-C., Tang, C.-H., Huang, K.-C., Huang, S.-Y., & Sue, Y.-M. (2018). Increased risk of incident psoriasis in end-stage renal disease patients on chronic hemodialysis: A nationwide population-based cohort study. *The Journal of Dermatology*.
- Wang, Z., Mascarenhas, N., Eckmann, L., Miyamoto, Y., Sun, X., Kawakami, T., & Di Nardo, A. (2017). Skin microbiome promotes mast cell maturation by triggering stem cell factor production in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4), 1205–1216.e6.
- Weatherhead, S., Robson, S. C., & Reynolds, N. J. (2007). Management of psoriasis in pregnancy. *BMJ*, 334(7605), 1218–1220.
- Wedad Z. Mostafa and Rehab A. Hegazy (2015). Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J Adv Res.* 6(6):793-804
- Weiss, G., Shemer, A., & Trau, H. (2002). The Koebner phenomenon: review of the literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 16(3)
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 478–494.
- Wessberg J, Olausson H, Fernström KW, Vallbo AB (2003). Receptive field properties of unmyelinated tactile afferents in the human skin. *J Neurophysiol.* 89(3):1567-75.
- WHITTIER, F. C, M.D.; DAN H. EVANS, M.D.; PHILIP C. ANDERSON, M.D.; KARL D. NOLPH, M.D. (1983). Peritoneal Dialysis for Psoriasis: A Controlled Study. *Annals of Internal Medicine*, 99(2).

William J. Roberts Gregg R. Levitt (1982). Histochemical evidence for sympathetic innervation of hair receptor afferents in cat skin. *J Comp Neurol*. 210(2):204-9.

Xie, L., Takahara, M., Nakahara, T. et al. (2011). CD10-bearing fibroblasts may inhibit skin inflammation by down-modulating substance P. *Arch Dermatol Res* 303, 49–55.

Yarwood, J. M., Leung, D. Y. M., & Schlievert, P. M. (2000). Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 1–7.

Yates VM, Watkinson G, Kelman A (1982). Further evidence for an association between psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis. *Br J Dermatol* 106: 323-330.

Yin, L., Hu, Y., Xu, J., Guo, J., Tu, J., & Yin, Z. (2017). Ultraviolet B Inhibits IL-17A/TNF- α -Stimulated Activation of Human Dermal Fibroblasts by Decreasing the Expression of IL-17RA and IL-17RC on Fibroblasts. *Frontiers in Immunology*, 8.

Yuan, Y., Qiu, J., Lin, Z.-T., Li, W., Haley, C., Mui, U. N., ... Wu, T. (2019). Identification of Novel Autoantibodies Associated with Psoriatic Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*.

Zanchi, M., Favot, F., Bizzarini, M., Piai, M., Donini, M., & Sedona, P. (2008). Botulinum toxin type-A for the treatment of inverse psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(4), 431–436.

Zhan, M., Zheng, W., Jiang, Q. et al. (2017). Upregulated expression of substance P (SP) and NK1R in eczema and SP-induced mast cell accumulation. *Cell Biol Toxicol* 33, 389–405.

Zhu, T. H., Nakamura, M., Farahnik, B., Abrouk, M., Lee, K., Singh, R., ... Bhutani, T. (2016). The Role of the Nervous System in the Pathophysiology of Psoriasis: A Review of Cases of Psoriasis Remission or Improvement Following Denervation Injury. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17(3), 257–263.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Dmitri Šišmintsev,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Psoriaasiga seotud neuronaalsete valkude ekspressiooni uurimine”, mille juhendajad on Kristina Mäemets-Allas ja Viljar Jaks, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Dm, Šišmintsev

03.06.2020